UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Doct. Univ. Paris (Pharm.) Série U, N° 135 Année 1947/1948

RECHERCHES SUR LES INOSITOLPHOSPHATES OBTENUS PAR HYDROLYSE PHYTASIQUE DE L'ACIDE INOSITOLHEXAPHOSPHORIQUE

THÈSE

pour l'obtention du Grade de Docteur en Pharmacie

(UNIVERSITÉ)

Présentée et soutenue le 13 Juillet 1948

PAR

Guy JOSEPH

PHARMACIEN

EX-INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

TITULAIRE DES CERTIFICATS D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE APPLIQUÉE ET DE MICROBIOLOGIE, SÉROLOGIE, HÉMATOLOGIE ET PARASITOLOGIE

JURY { MM. P. FLEURY, Président
J.-A. GAUTIER, Professeur
J. COURTOIS, Assesseur

" SOCIÉTÉ DUNOISE D'ÉDITION "
CHATEAUDUN
— 1948 —

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du candidat : **JOSEPH**

Prénom : **GUY**

Date de soutenance : .....

Numéro d'ordre : .....

JOSEPH Guy.
— Recherches sur les inositolphosphates obtenus par hydrolyse phytasique de l'acide inositolhexaphosphorique. — Châteaudun, Imp. de la Société Dunoise d'Editon, 1948, in-8°, 112 p.

Th. Doct. en Pharm. Paris, 1948. *Série Université*, n° 135.

JOSEPH Guy.
— Recherches sur les inositolphosphates obtenus par hydrolyse phytasique de l'acide inositolhexaphosphorique. — Châteaudun, Imp. de la Société Dunoise d'Editon, 1948, in-8°, 112 p.

Th. Doct. en Pharm. Paris, 1948. *Série Université*, n° 135

JOSEPH Guy.
— Recherches sur les inositolphosphates obtenus par hydrolyse phytasique de l'acide inositolhexaphosphorique. — Châteaudun, Imp. de la Société Dunoise d'Editon, 1948, in-8°, 112 p.

Th. Doct. en Pharm. Paris, 1948. *Série Université*, n° 135.

JOSEPH Guy.
— Recherches sur les inositolphosphates obtenus par hydrolyse phytasique de l'acide inositolhexaphosphorique. — Châteaudun, Imp. de la Société Dunoise d'Editon, 1948, in-8°, 112 p.

Th. Doct. en Pharm. Paris, 1948. *Série Université*, n° 135.

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Doct. Univ. Paris (Pharm.) Série U, N° 135 Année 1947/1948

RECHERCHES SUR LES INOSITOLPHOSPHATES OBTENUS PAR HYDROLYSE PHYTASIQUE DE L'ACIDE INOSITOLHEXAPHOSPHORIQUE

THÈSE

pour l'obtention du Grade de Docteur en Pharmacie
(UNIVERSITÉ)

Présentée et soutenue le 13 Juillet 1948

PAR

Guy JOSEPH

PHARMACIEN
EX-INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS
TITULAIRE DES CERTIFICATS D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE APPLIQUÉE ET DE MICROBIOLOGIE, SÉROLOGIE, HÉMATOLOGIE ET PARASITOLOGIE

JURY { MM. P. FLEURY, Président
J.-A. GAUTIER, Professeur
J. COURTOIS, Assesseur

" SOCIÉTÉ DUNOISE D'ÉDITION "
CHATEAUDUN
— 1948 —

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION :

MM. RENÉ FABRE, *Doyen*, O. ✻, Q I.
MARCEL SOMMELET, *Assesseur*, ✻, Q I.
H.-J. LIONNET, *Secrétaire*, ✻, Q I.
L. JEANDEL, *Rédacteur*, Q A.

PROFESSEURS :

MM.	SOMMELET, ✻, Q I. . .	Chimie organique.
	FABRE, O. ✻, Q I . . .	Toxicologie.
	PICON, ✻, Q I.	Chimie minérale.
	DELABY, ✻, Q I	Pharmacie chimique.
	MASCRE, ✻, Q I	Botanique.
	SARTORY, C. ✻, Q I. . .	Microbiologie.
	FLEURY, ✻, Q I	Chimie biologique.
	JANOT, Q I.	Pharmacie galénique.
	CHARONNAT, Q I . . .	Chimie analytique.
	VALETTE, Q I.	Zoologie appliquée.
	BEDEL, ✻, Q I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
	GUILLOT	Physique.
	RAOUL	Professeur sans chaire.
	GAUTIER	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✻, Q I.

Professeurs honoraires :

MM. DELEPINE, O, ✻, Q I. et LEBEAU, O. ✻, Q I., Membres de l'Institut, PERROT, C. ✻, Q I., COUTIERE, O. ✻, Q I., BOUGAULT, O. ✻, Q I., LUTZ, ✻, Q I., GORIS, O. ✻, Q I., HERISSEY, O. ✻, Q I., LAUNOY, O. ✻, Q I.

MAITRES DE CONFÉRENCES :

MM.	DOMANGE, Q I	Sciences physiques et chimiques.
	CRETE	Sciences naturelles.
	COURTOIS	Sciences physiques et chimiques.
	MORETTE	Sciences physiques et chimiques.
Mlle	LAMBIN, Q I	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM.	CORRIEZ, Q I.	Physique.
	HARISPE, travaux pratiques de 1re année . .	Chimie générale et pharmaceutique.
	CAVIER	Biologie animale.
	TRUHAUT, ✻, Q A., travaux pratiques de 4e année	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.
	MOREAU	Chimie analytique.
	DEYSSON	Botanique.
	GERMAN (F.F.)	Microbiologie.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, Q I.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, Q A.

À Monsieur le Professeur P. FLEURY

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN-CHEF DES HOPITAUX PSYCHIATRIQUES DE LA SEINE

qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à nos recherches et d'accepter la Présidence de cette thèse.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.-A. GAUTIER

PROFESSSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN-CHEF DES HOPITAUX PSYCHIATRIQUES DE LA SEINE

qui a bien voulu examiner notre travail.

Respectueux hommage.

A Monsieur J. COURTOIS

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN DES HOPITAUX DE PARIS

En témoignage de notre profonde gratitude.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

INTRODUCTION

Les esters phosphoriques de l'inositol naturel (mésoinositol) représentent pratiquement les seuls dérivés biochimiques de ce polyol.

L'inositol avec ses six fonctions alcooliques et l'acide orthophosphorique avec ses trois fonctions acides peuvent former un grand nombre de combinaisons. A notre connaissance seuls ont été décrits jusqu'ici des esters d'une seule fonction acide de l'acide orthophosphorique.

Selon le nombre de fonctions alcooliques de l'inositol estérifié il est possible d'envisager six catégories de mono-esters. A l'exclusion de l'ester hexaphosphorique, il peut exister dans chaque catégorie un certain nombre d'isomères soit de position, soit stéréochimiques.

Un bel ensemble de recherches de chimie organique auxquelles S. et T. POSTERNAK prirent une part prépondérante ont permis d'assigner récemment au mésoinositol la structure suivante (1) [46].

$$\frac{1-2-4-6}{3-5}$$

Les représentants des six catégories de monoesters orthophosphoriques ont été décrits, mais un seul a été l'objet de recherches poussées : l'acide inositolhexaphosphorique (acide phytique) dont les sels représentent la principale substance de réserve phosphorée des végétaux.

La structure des autres inositolphosphates demeure encore très mal connue, c'est ainsi que l'on ignore si dans les dérivés di-tri ou tétraphosphoriques les liaisons esters ou les fonctions alcooliques libres se trouvent disposées en ortho-méta ou para.

(1) Nous suivons la notation de MAQUENNE complétée par LESPIAU, la configuration est indiquée par une fraction ; les chiffres du numérateur indiquent les carbones sur lesquels les OH sont fixés au-dessus du plan du cycle, les chiffres du dénominateur les carbones dont les OH sont en dessous du plan.

A plus forte raison, pour les esters estérifiés par une à cinq molécules d'acide phosphorique la structure stéréochimique n'a pas encore été élucidée.

Nous nous sommes proposés de préciser la constitution de certains de ces esters.

Dans le premier chapitre, nous exposerons nos connaissances actuelles sur les inositolphosphates renfermant moins de six molécules d'acide phosphorique. Nous avons préparé les esters mono-tri et tétraphosphoriques à partir des produits d'hydrolyse partielle de l'inositolhexaphosphate par les enzymes du son de Blé. Nous avons, par ailleurs, extrait l'inositolpentaphosphate des germes de Blé.

Ces corps ont été obtenus en suivant la technique de S. et T. POSTERNAK à laquelle nous avons apporté quelques modifications de détail.

Dans le second chapitre nous décrivons les méthodes employées pour analyser ces corps. A ce sujet nous apportons une innovation sur les recherches antérieures : le dosage à l'aide de l'acide periodique de l'inositol libéré par hydrolyse sulfurique. Il est ainsi possible de fixer le rapport molécules d'acide phosphorique/molécules d'inositol alors que dans les précédentes études les auteurs ne pouvaient tabler que sur les teneurs en carbone et hydrogène déterminées par combustion et dosage du phosphore.

Dans le troisième chapitre nous indiquons les techniques utilisées pour la préparation des différents esters étudiés.

Dans la seconde partie de ce travail nous avons soumis les corps obtenus à l'action de divers oxydants plus ou moins sélectifs : acide periodique, brome en milieu bicarbonaté — solution nitrochromique. Le comportement des inositolphosphates diffère de celui d'autres dérivés du cyclohexane possédant des fonctions α-glycol, il est donc vraisemblable que les esters tri et tétraphosphoriques de l'inositol ne possèdent pas de fonctions alcooliques libres contiguës.

La dernière partie de ce travail est consacrée à l'étude de l'action de diverses préparations phosphatasiques sur les esters étudiés. J. COURTOIS [26] avait remarqué que des préparations actives sur le β glycérophosphate étaient inactives sur l'inositolhexaphosphate ; par contre elles sont capables d'hydrolyser les esters moins riches en phosphore qui se forment au cours d'une hydrolyse sulfurique partielle de l'inositolhexaphosphate (1).

(1) Dans ces recherches préliminaires, J. COURTOIS [26] n'avait pas tenté de préciser la nature des esters formés.

Nous avons pu confirmer et préciser ces faits; diverses préparations phosphatasiques inactives sur les esters hexa et pentaphosphoriques, hydrolysent les mono-tri et parfois même le tétraphosphate.

Ces résultats nous ont permis de préciser les spécificités respectives des phytases et phosphatases.

Nos recherches n'apportent sans doute que peu de résultats définitifs, mais dans un domaine aussi vaste et aussi complexe, fournissent un ensemble de notions qui nous paraissent utilisables pour des investigations ultérieures.

C'était, nous le pensons, le but du travail qui nous a été confié.

Nous avons entrepris nos recherches dans le laboratoire de M. le Professeur FLEURY. Nous tenons à lui exprimer notre respectueuse gratitude pour tout l'intérêt qu'il nous a constamment porté au cours de trois années consacrées à ce travail. Nous sommes particulièrement sensibles à l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre Jury de thèse.

Nous remercions sincèrement M. J.-A. GAUTIER, Professeur, Pharmacien-chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine, qui a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury d'examen de thèse et qui nous fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail.

Nous prions M. J. COURTOIS, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie, Pharmacien des Hôpitaux de Paris, de bien vouloir accepter nos très sincères remerciements.

Nous ne saurions oublier les conseils qu'il n'a cessé de nous donner chaque jour dans ce laboratoire, sachant trouver à chaque échec les amicales paroles de réconfort. C'est grâce à sa compétence toute particulière dans ce domaine que nous avons pu conduire à bien la tâche qu'il nous avait confiée. Qu'il soit assuré de notre profonde et très respectueuse reconnaissance.

Nous voudrions également rendre un hommage ému à la mémoire de M. G. POIROT, Pharmacien des Hôpitaux, qui fut pour nous un excellent Maître d'Internat. Parmi les multiples conseils qu'il nous prodigua nous signalerons en particulier que c'est lui qui nous incita à entreprendre ce travail. Nous conserverons toujours de lui un souvenir reconnaissant.

Nous remercions M. E. CATTELAIN, Docteur ès-sciences physiques, assistant de la Chaire de Chimie Biologique, de l'intérêt qu'il nous a témoigné pendant la durée de ces travaux. Nous lui adressons l'expression de nos sentiments très reconnaissants pour la sincère amitié et la grande sollicitude qu'il n'a cessé de nous manifester

PLAN

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I. — Les inositolphosphates actuellement décrits.

CHAPITRE II. — A) Techniques analytiques utilisées au cours de nos recherches pour déterminer la composition des inositolphosphates.

B) Techniques analytiques utilisées pour l'étude de la structure des inositolphosphates.

CHAPITRE III. — Techniques de préparations des inositolphosphates étudiés au cours de ce travail.

DEUXIÈME PARTIE

Action de divers oxydants sur les esters hexa - penta - tétra et triphosphoriques de l'inositol

CHAPITRE I. — Action des divers oxydants sur les esters penta et hexaphosphoriques.

CHAPITRE II. — Action des divers oxydants sur l'acide inositol-tétraphosphorique.

CHAPITRE III. — Action des divers oxydants sur l'acide inositol-triphosphorique.

CHAPITRE IV. — Action des oxydants sur quelques polyols dérivant du cyclohexane.

CHAPITRE V. — Discussion des résultats.

CHAPITRE VI. — Influence du pH sur l'hydrolyse de deux inositolphosphates.

TROISIÈME PARTIE

Action de diverses préparations phosphatasiques sur quelques inositolphosphates.

Protocole des essais.

Hydrolyses comparées de l'inositolpentaphosphate et d'un mélange équimoléculaire d'inositoltétra et hexaphosphates.

Conclusions générales.

Bibliographie.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

Les inositolphosphates actuellement décrits

Nous n'étudierons pas dans ce chapitre l'acide inositolhexaphosphorique (acide phytique) dont la constitution est maintenant bien précisée (1).

Les autres inositolphosphates décrits ont été soit extraits de substances végétales, soit séparés après hydrolyse partielle de l'inositolhexaphosphate par la phytase. A ce sujet une remarque s'impose, il est en effet très vraisemblable que les inositolphosphates, moins riches en phosphore que l'acide phytique, séparés des végétaux dérivent de cet acide phytique. Les auteurs ne paraissent pas s'être préoccupés de l'action possible des phytases présentes dans ces végétaux.

On peut en effet supposer que ces inositolphosphates ont pu se former à partir de l'acide phytique du végétal au cours de leur conservation. Il y aurait intérêt à utiliser dans ce domaine les méthodes employées avec succès pour l'isolement des hétérosides sous leur forme naturelle ; inactivation des enzymes associés par la chaleur en présence d'alcool.

Nous allons maintenant résumer les données acquises sur les divers inositolphosphates décrits.

I. — *ACIDE INOSITOLMONOPHOSPHORIQUE*

Anderson R.J. [3] semble être le premier à décrire un composé de ce type. En 1914 il épuise le son du Blé par l'acide chlorhydrique

(1) Des exposés généraux sur l'acide phytique et ses sels ont été présentés par Colin Y. : « Recherches techniques sur la séparation et le dosage des principes immédiats phosphorés des graines » (Th. Doct. Univ. Sc., Paris 1935) ; Michel Durand E. : « Le Phosphore des végétaux », Tome I (Presses Universitaires, Paris 1939) ; Guillemet R. : « L'acide phytique ». (Etude biochimique et physiologique. Biologie Médicale, 1946 ; *35* - 88).

dilué, il précipite par la baryte les orthophosphates et inositolphosphates riches en phosphore. Le sel de Baryum de l'acide inositolmonophosphorique est en effet soluble, ce qui facilite sa séparation. Le monophosphate est alors précipité sous forme de sel de plomb et en est libéré par l'hydrogène sulfuré, ces opérations sont répétées un certain nombre de fois — l'acide libre cristallise à partir de sa solution concentrée. Cet acide libre est soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques, ses sels alcalino-terreux sont solubles dans l'eau. Le nitrate d'argent (même en milieu ammoniacal), le chlorure ferrique, le sulfate cuivrique, et le molybdate d'ammonium ne le précipitent pas, ce qui le différencie de l'acide phytique.

L'année suivante ANDERSON [5] sépara un inositolmonophosphate de propriétés analogues après hydrolyse partielle de la phytine par les enzymes du son de Blé. En 1929 S. et T. POSTERNAK [68] purent répéter cette expérience.

L'inositolhexaphosphate de sodium est hydrolysé en milieu faiblement acide par la phytase du son de froment. Lorsque 70 pour 100 de l'acide phosphorique se trouve libéré, le mélange est traité par l'acétate de baryum en milieu ammoniacal. Le monophosphate demeure en solution et est séparé sous forme de sel plombique. L'acide libre cristallise en longues aiguilles; il est inactif sur la lumière polarisée ; le sel de baryum avec 4 OH_2 est précipitable par l'alcool des solutions aqueuses.

Un certain nombre de recherches récentes ont réussi à montrer que l'acide inositolmonophosphorique rentre aux côtés des acides glycérolmonophosphoriques, dans la constitution des phospholipides.

Les dérivés phosporés de l'inositol furent tout d'abord signalés dans les phosphatides des bacilles tuberculeux.

En 1938, ANDERSON R. J., LOTHROP W. C. et CREIGHTON M. M. [8], séparent du bacille tuberculeux humain une fraction phosphatidique; cette dernière saponifiée, conduit à un ester phosphorique, insoluble dans l'alcool, hydrolysable par les acides en mannose-inositol et acide phosphorique.

En appliquant à cet ester la technique permettant d'hydrolyser les nucléotides en nucléosides (chauffage de 8 heures à 170° dans l'ammoniaque à 14 p. 100), l'ester est déphosphorylé. La fraction glucidique dénommée mannoinositose résulte de l'union d'une molécule d'inositol à deux molécules de mannose (1).

(1) Le mannoinositose parait exister à l'état libre dans les bacilles d'origine aviaire (DU MONT H. et ANDERSON R. J., Z. Physiol. Chem. 1932, *211*, 97). Ce serait, à notre connaissance le seul dérivé non phosphoré de l'inositol signalé chez les êtres vivants.

Par la suite CASON J. et ANDERSON R.J. [18] fractionnèrent les produits de saponification de phospholipides des bacilles d'origine bovine. Ils purent en séparer un ester monophosphorique de disaccharide qui fournit avec netteté la réaction colorée de SCHERER-GALLOIS caractéristique de l'inositol [38]. Une autre fraction, non précipitable par le plomb et précipitable par l'alcool, libère par hydrolyse sulfurique : du mannose, de l'inositol, un sucre réducteur non identifié et une petite quantité (dix-neuf milligrammes) d'un corps séparé sous forme de sel de baryum. Ce sel donne un test de SCHERER positif, et présente la composition centésimale d'un inositolmonophosphate.

Parallèlement à ANDERSON, MACHEBŒUF et ses collaborateurs [65] obtinrent des résultats analogues.

MACHEBŒUF observa que l'activité haptène de pouvoir fixer l'alexine appartient principalement aux substances précipitables par l'acétone de caractère phospholipidique. Les phospholipides de plusieurs kilogrammes de corps bactériens furent fractionnés par l'alcool méthylique, les fractions à forte activité haptène fournissent par hydrolyse : des acides gras, de l'inositol, du glycérol et de l'acide phosphorique. Après hydrolyse barytique ménagée il fut impossible d'obtenir les esters monophosphoriques de l'inositol et du glycérol.

MACHEBŒUF considère que les composés étudiés se rapprochent plus des acides phosphatidiques que des phosphoaminolipides. « Ces acides inositophosphatidiques semblent bien être les supports de l'activité, car les purifications n'ont jamais permis de séparer d'une façon perceptible activité et acides inositophosphatidiques ».

L'inositol, ne paraît pas être, comme on aurait pu le croire, caractéristique des phospholipides du bacille tuberculeux. En 1939, KLENK E. et SAKAI R. [63] séparèrent des produits de saponification des phosphatides du Soja un ester phosphorique à sel de baryum soluble et sel de plomb insoluble. Cet ester a la composition d'un inositolmonophosphate.

L'acide libre est hygroscopique, il paraît cristalliser avec trois molécules d'eau, il ne possède pas de point de fusion net; à 110°, il se gonfle et brunit.

Le sel de baryum précipité par l'alcool est amorphe et renferme deux molécules d'eau; le sel de brucine obtenu par cristallisation en milieu acétonique fond à 236°.

KLENK et SAKAI purent également séparer un autre ester phosphorique moins riche en baryum et phosphore que l'inositolmonophosphate, cet ester fournit un test de SCHERER positif et dévie la lumière polarisée.

Il est vraisemblable que l'acide inositolmonophosphorique est présent dans d'autres phospholipides. FOLCH J. et WOOLEY S.M. [59] séparèrent de l'inositol après saponification puis hydrolyse des phosphatides du cerveau ; certaines fractions phosphatidiques renfermant jusqu'à 10 p. 100 d'inositol combiné.

La phytase est un enzyme peu répandu, l'acide phytique représente la majeure partie du phosphore organique des végétaux. Il n'est donc pas étonnant que l'humus renferme des inositolphosphates.

En 1940, YOSHIDA R.K. [80] sépare de trois échantillons du sol de Hawaï, un ester de l'inositol possédant la composition d'un monophosphate. BOWER C.A. [16] reprenant ces essais réussit à identifier dans les sols divers inositolphosphates mais ne put y caractériser d'inositolmonophosphate.

Nous signalerons enfin qu'ANDERSON [2] put séparer un inositolmonophosphate des produits d'hydrolyse acide partielle de l'acide phytique.

Il est possible de prévoir l'existence de six acides inositolmonophosphoriques stéréoisomères. La plupart des inositolmonophosphates ont été isolés avec de si faibles rendements qu'il est difficile de les comparer entre eux et à plus forte raison de fixer l'emplacement de la liaison ester phosphorique. Toutefois, il est vraisemblable, que l'inositolmonophosphate actif sur la lumière polarisée isolé des phosphatides du Soja KLENK et SAKAI [63] est un isomère des corps inactifs décrits par ANDERSON [3] et S. et T. POSTERNAK [68].

II. — *ACIDE INOSITOLDIPHOSPHORIQUE*

C'est le moins fréquemment signalé des inositolphosphates. S. et T. POSTERNAK [68] l'obtinrent avec un faible rendement après hydrolyse phytasique de 70 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié du phytinate de sodium. Le corps isolé est lévogyre. L'oxydation nitrique d'un mélange d'inositolmono et diphosphates a permis à S. et T. POSTERNAK de séparer l'ester monophosphorique de l'acide tartrique, ces auteurs en déduirent que le diphosphate possède ses liaisons ester en ortho ou méta.

III. — *ACIDE INOSITOLTRIPHOSPHORIQUE*

ANDERSON [4], en 1915, sépara avec difficulté du son de Blé un corps possédant la composition centésimale d'un triphosphate d'inosite. Ce corps fut obtenu par des précipitations répétées du sel de baryum par l'alcool en milieu chlorhydrique, puis nouvelle précipitation par le cuivre, libération par l'hydrogène sulfuré et cristallisation du sel de strychnine.

L'acide inositoltriphosphorique ne précipite ni à froid, ni à chaud, avec le molybdate d'ammonium, il en est de même avec le nitrate d'argent; par contre, il se forme un précipité avec le nitrate d'argent ammoniacal; les sels neutres de cuivre et baryum sont insolubles. ANDERSON ne put réussir à faire cristalliser l'acide libre et les sels de baryum.

En 1917, RATHER J.B. [74] isola du tourteau de coton un corps possédant la composition centésimale d'un triphosphate d'inositol, il en obtint un sel de strychnine cristallisé P.F. = 210°.

Cet ester résulte vraisemblablement d'une hydrolyse phytasique partielle. ANDERSON [1] n'avait pu précédemment isoler de ce tourteau qu'un hexa-phosphate. ANDERSON [2] a également séparé avec un mauvais rendement un triphosphate après hydrolyse chlorhydrique partielle de l'acide phytique. S. et T. POSTERNAK [68] ont isolé un triphosphate lévogyre après hydrolyse phytasique partielle (70 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié libéré) du phytinate de sodium.

Enfin BOWER C.A. [17] sépara de l'humus des esters phosphoriques de l'inositol dont la composition se rapproche du triphosphate.

A notre connaissance, la structure de ces divers inositoltriphosphates n'a jamais été précisée.

IV. — *ACIDE INOSITOLTÉTRAPHOSPHORIQUE*

ANDERSON [2] obtint un mélange de tétra et pentaphosphates par hydrolyse chlorhydrique partielle de la phytine. S. et T. POSTERNAK [67] séparèrent avec un assez bon rendement ce corps des produits d'hydrolyse partielle de l'hexaphosphate par la phytase (34 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié libéré). L'ester obtenu est faiblement lévogyre. Enfin, F. FISHLER [43] a pris en 1939 le brevet allemand 684.946 pour la préparation d'inositoltétraphosphate à partir du son. Le son est lixivié par les acides dilués à chaud et l'ester est précipité à l'état de sel alcalino-terreux.

V. — *ACIDE INOSITOLPENTAPHOSPHORIQUE*

ANDERSON [2] obtint ce corps mélangé de tétraphosphate après hydrolyse chlorhydrique partielle de la phytine. CLARKE G. [19] put extraire de la Moutarde sauvage de l'Inde un ester phosphorique de l'inositol contenant 12 atomes de carbone et 10 atomes de phosphore.

RATHER J.B. [74] [75] a séparé de diverses substances végétales (tourteau de Coton — Blé — Riz — Avoine) des corps possédant la composition centésimale de pentaphosphates. Par la suite, ANDERSON [7] sépara un composé analogue des graines d'Erable, il est possible que ce corps résulte d'une hydrolyse phytasique partielle.

ANDERSON avait en effet, utilisé des graines pulvérisées, délipidées à l'éther et conservées pendant trois années au laboratoire. En répétant son essai, sur des graines fraîches, il ne put en extraire que de l'inositolhexaphosphate. S. et T. POSTERNAK [69] isolèrent des germes de Blé, un corps présentant la même composition centésimale que le pentaphosphate d'ANDERSON ; ils démontrèrent que leur composé n'était pas un pentaphosphate mais une association équimoléculaire d'hexaphosphate et d'un tétraphosphate. Ils purent séparer ces deux corps : le sel double de sodium et calcium du présumé pentaphosphate, laisse en effet cristalliser le sel double de calcium et sodium caractéristique de l'acide phytique. Le filtrat renferme un tétraphosphate d'inositol qui fut séparé sous forme de son sel acide de baryum. Ce tétraphosphate a sensiblement le même pouvoir rotatoire lévogyre que celui obtenu après hydrolyse partielle du phytinate.

D'ailleurs, le tétraphosphate obtenu à l'aide de la phytase donne avec l'hexaphosphate des cristaux mixtes d'un sel de baryum présentant la composition d'un pentaphosphate.

A notre connaissance, l'on n'a jamais recherché si les pentaphosphates de CLARKE, RATHER, ANDERSON, étaient de véritables dérivés pentaphosphoriques ou des associations de tétra et hexaphosphates.

Nous signalerons enfin qu'ANDERSON [6] phosphorylant l'inositol par un mélange d'acide orthophosphorique et anhydride phosphorique, obtint un corps mal défini qu'il considère comme un ester dipyrophosphorique de l'inositol.

De l'ensemble de ces travaux, il résulte que les esters phosphoriques de l'inositol demeurent très mal connus ; les données sur leur structure sont minimes surtout si l'on tient compte du fait que pour chaque catégorie d'esters il peut exister de nombreux isomères soit de position, soit stéréochimiques.

CHAPITRE II

A. — Techniques analytiques utilisées au cours de nos recherches pour déterminer la composition des inositolphosphates.

Les esters dont nous décrivons la préparation dans le chapitre suivant ont été analysés par la détermination de chacun de leurs constituants : phosphore-inositol et baryum. Nous tenons compte surtout de la valeur du rapport molécules d'acide phosphoriques/molécules d'inositol qui fournit des données plus précises que la détermination des teneurs en phosphore et baryum seuls.

DÉTERMINATION DU PHOSPHORE

Nous avons utilisé deux méthodes :

a) MÉTHODE DE COPAUX

Nous ne rappellerons que le principe de cette méthode classique J. LANGE [64], J. COURTOIS [23].

Après minéralisation nitromagnésienne au four électrique, l'acide phosphorique est précipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. Celui-ci est recueilli par filtration, dissous dans 10 cm³ d'acide nitrique dilué au demi, et dosé sous forme d'un complexe : L'acide phosphoduodécimolybdique qui associé à de l'eau et de l'éther se précipite sous forme d'un liquide jaune huileux plus dense que l'eau.

Cette technique fut surtout employée pour suivre les hydrolyses diastasiques ou pour effectuer une détermination approximative de la teneur en phosphore dans chacun de ces esters, nous nous sommes adressés à une technique beaucoup plus rigoureuse ; la méthode de NEUMANN adaptée par M. MACHEBŒUF et P. FLEURY.

b) MÉTHODE DE NEUMANN

PRINCIPE

L'acide phosphorique est précipité sous forme de phosphomolybdate d'ammonium. Ce dernier est redissous dans l'ammoniaque puis l'acide phosphomolybdique est titré alcalimétriquement après élimination de l'ammoniaque par ébullition en présence de soude titrée.

TECHNIQUE

Elle peut être subdivisée en trois parties.

1° *Minéralisation du phosphore organique.* — Dans un petit creuset de porcelaine nous mesurons une prise d'essai renfermant de 0,3 à 1,0 mg de phosphore (soit 0,5 à 2 mg de P_2O_5) qui est additionnée de 1 cm³ d'acide nitrique pur à 36° Bé et de 2 cm³ d'une solution saturée de nitrate de magnésium :

$(NO_3)^2 Mg, 6 OH_2$ = 50 gr. Eau q.s.p. 100 cm³)

Le contenu du creuset est évaporé à siccité au bain-marie bouillant. Ce résidu est complètement déshydraté par chauffage d'une heure, soit sur une plaque chauffante, soit à l'orifice d'un four à moufle (1).

Pour éviter les pertes par projection, il est utile d'adapter un couvercle sur le creuset, nous calcinons enfin par un chauffage de 20 à 30 minutes vers 600°.

Après refroidissement, le résidu blanc est humecté avec quelques gouttes d'acide nitrique puis quelques gouttes d'eau, après un léger chauffage au bain-marie, le précipité se dissout.

Ce liquide et les eaux de lavages sont transvasés dans un tube jaugé à 11 cm³. Le contenu du tube est centrifugé, quelques minutes pour séparer les particules silicoalumineuses provenant du creuset, qui risqueraient de colmater le filtre dans la suite du dosage. Le tube à centrifuger est retourné sur un verre à pied bien sec pour laisser égoutter; nous prélevons à l'aide d'une pipette à un trait 10 cm³ de liquide.

2° *Précipitation du phosphomolybdate d'ammonium.* — Les 10 cm³ de solution phosphorique ou provenant de la minéralisation précédente sont versés dans un petit Erlenmeyer de 60 cm³ et additionnés de 5 cm³ de solution acide de nitrates : $(NO_3)^2$ Mg, 6 OH_2 = 30 gr. — NO_3NH_4 = 60 gr. NO_3H, 36° Bé = 80 cm³ ou 66 cm³ à 40° Bé — SO_4H_2 pur = 16 cm³ — OH_2 q.s.p. 200 cm³).

Le flacon est plongé cinq minutes dans un bain-marie bouillant. Nous ajoutons à ce moment brutalement 3 cm³ de solution molybdique (Molybdate d'ammonium 50 gr. ammoniaque officinale = 4 cm³ (2). Eau distillée q.s.p. 500 cm³) en évitant de faire couler cette solution le long des parois du récipient, car il y aurait précipitation de l'acide molybdique. L'Erlenmeyer est replongé à nouveau pendant dix minutes dans le bain-marie bouillant; le précipité qui s'est formé se dépose rapidement. Nous refroidissons sous un courant d'eau puis ajoutons 5 cm³ d'alcool à 95°.

(1) Cette déshydratation évite les projections qui se produisent au cours d'une calcination trop brutale.

(2) L'addition d'ammoniaque évite la précipitation d'acide molybdique au cours de la conservation.

3° *Dosage du phosphomolybdate d'ammonium précipité.* — Le liquide est filtré sur un filtre en verre poreux G4. Le flacon et le filtre sont lavés soigneusement avec cinq fois 2 cm³ d'alcool dilué (alcool à 95° = 55 cm³, eau q.s.p. 100 cm³). Nous rejetons le filtrat et les liquides de lavage. Nous versons alors 2 cm³ d'ammoniaque dilué dans le ballon et le transvasons sur le précipité, il est nécessaire de laisser en contact quelques minutes en facilitant la dissolution à l'aide d'un agitateur à extrémité aplatie.

La solution ammoniacale est recueillie par aspiration modérée dans un tube à essai placé dans la fiole à vide. Le flacon et le filtre sont lavés à nouveau avec 2 cm³ d'ammoniaque diluée et 10 cm³ d'eau.

Dans un Erlenmyer de 500 cm³ nous mesurons 25 cm³ de soude N/25, 150 cm³ d'eau distillée, nous ajoutons la solution ammoniacale obtenue et dix gouttes d'une solution alcoolique à 1 p. 100 de phtaléine du phénol.

L'ammoniaque utilisée ou provenant du phosphomolybdate d'ammonium, déplacée par la soude est éliminée par une ébullition franche de vingt minutes. Après avoir vérifié que toute l'ammoniaque est bien chassée à l'aide d'un papier de tournesol, nous cessons de chauffer. Après quelques minutes nous ajoutons 25 cm³ de solution d'acide sulfurique N/25 et portons de nouveau deux minutes à l'ébullition pour chasser le gaz carbonique qui a pu être fixé par la soude.

Sans laisser refroidir nous titrons l'acide sulfurique en excès par la soude N/25 jusqu'à l'apparition d'une teinte rose très pâle. Dès le premier virage, nous portons de nouveau à l'ébullition, il se produit une décoloration et 0.2 à 0,5 cm³ de soude N/25 se sont révélés nécessaires pour rétablir la teinte rose pâle indiquant le virage définitif qui doit se faire à la température de l'ébullition.

CALCUL

Soit N le nombre de centimètres cubes de soude N/25 consommés.

$N \times 0{,}0437$ représente le phosphore en milligrammes dans les 10 cm³ employés soit $N \times 0{,}04857$ pour les 11 cm³ représentant la prise d'essai minéralisée.

Si nous exprimons le résultat en milligrammes de P_2O_5, $N \times 0{,}1$ exprime la quantité dans 10 cm³ et $N \times 0{,}11$ pour 11 cm³ correspondant à la prise d'essai minéralisée.

DOSAGE DU BARYUM

Tous les inositolphosphates furent isolés à l'état de sels de baryum.

Nous avons dosé ce métal par la méthode classique de pesée du sulfate de baryum. Le choix de la technique n'est pas indifférent car le précipité retient facilement de l'acide phosphorique. Nous avons réussi à mettre au point le protocole suivant qui dans l'ensemble nous a donné satisfaction.

0,50 gramme de sel de baryum sont dissous dans 10 cm^3 d'acide chlorhydrique officinal dilué au 1/10e (acide environ N). Nous portons à l'ébullition quelques instants pour amener la dissolution de la prise d'essai, puis étendons d'eau de façon à obtenir un volume de 250 cm^3 environ. Après avoir ajouté très lentement 20 cm^3 d'acide sulfurique normal, nous maintenons toujours une lente ébullition pendant au moins trois ou quatre heures en remplaçant l'eau évaporée. Le précipité de sulfate de baryum se sédimente pendant 12 heures à l'étuve à 37°, il est recueilli le lendemain sur un creuset de verre fritté G_4 préalablement séché et taré.

Nous dessèchons alors le creuset jusqu'à poids constant à l'étuve à 100°.

DOSAGE DE L'INOSITOL

Nous avons adopté la technique décrite par Mlle M.-C. Bailly [9] pour le dosage de l'inositol dans les inositolhexaphosphates de calcium et magnésium.

Après hydrolyse sulfurique, l'inositol libéré est titré par l'acide periodique comparativement avec une solution de concentration connue.

Dans un petit ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, nous délayons 0,50 gramme d'inositolphosphate dans 12 cm^3 d'acide sulfurique dilué au tiers en volume, et ajoutons quelques fragments de pierre ponce pour régulariser l'ébullition. Nous maintenons une ébullition lente et régulière pendant huit heures (1). Après refroidissement le produit d'hydrolyse est versé dans un ballon jaugé de 25 cm^3. Nous complétons à ce volume avec les eaux de lavage du petit ballon. Après soigneuse agitation, nous centrifugeons pour séparer le sulfate de baryum précipité. Dans un flacon d'Erlenmeyer bouché à l'émeri nous mesurons 2 cm^3 du liquide limpide surnageant, 15 cm^3 de solution sulfurique de periodate environ N/10 (2) et

(1) Cette opération nécessite une surveillance minutieuse pour obtenir une ébullition régulière. L'appareil ne doit présenter aucune fuite ; nous rejetons tout liquide qui a noirci par suite d'une concentration exagérée.

(2) Nous avons utilisé du periodate de sodium purifié d'après la technique préconisée par Mme Y. Fiévet [38]. La solution possède la formule suivante :
Periodate de sodium 15 gr. ; SO_4H_2 N - 150 cm^3 Eau q.s.p. 1000

0,5 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100 en volume nous complétons à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

D'autre part, nous préparons dans les mêmes conditions un témoin renfermant 2 cm³ d'une solution à 0,50 gr. p. 100 d'inositol pur additionné des mêmes quantités d'acide periodique et d'acide sulfurique.

Après 24 heures de contact à la température du laboratoire nous titrons l'excès d'acide periodique par la technique de P. FLEURY et Mlle JOLLY [54]. Le mélange réactionnel est neutralisé par addition de 20 cm³ de bicarbonate de potassium, à 20 p. 100. Nous ajoutons alors 20 cm³ d'anhydride arsénieux N/10 et 1 cm³ d'iodure de potassium à 20 p. 100.

Après quinze minutes de contact l'excès d'anhydride arsénieux est dosé par une solution d'iode N/10.

Nous constituons également un troisième essai témoin identique en substituant de l'eau distillée à la solution d'inositol. La différence entre les quantités d'iode N/10 utilisés par la solution témoin et l'une ou l'autre des solution d'inositol correspond à l'acide periodique réduit.

Si N = nombre de cm³ d'acide periodique N/10 réduits par 0,01 gr. d'inositol.

N′ = nombre de cm³ consommés par la prise d'essai analysée.

le rapport $\frac{N'}{N} \times 0{,}01$ représente en grammes la teneur en inositol de la prise d'essai.

B. — Techniques analytiques utilisées pour l'étude de la structure des inositolphosphates.

Pour essayer de définir la structure des inositolphosphates isolés, nous nous sommes adressés à plusieurs oxydants : l'acide periodique, oxydant sélectif qui attaque rapidement divers composés organiques en particulier les glycols α, selon la réaction de MALAPRADE puis FLEURY et ses collaborateurs LANGE et COURTOIS (27) (29). (1). Nous avons étudié également l'action du brome en milieu alcalin et du réactif nitrochromique.

(1) L'action oxydante de l'acide periodique a fait l'objet de deux récentes mises au point de J. COURTOIS [27] [29].

I. — *OXYDATION PAR L'ACIDE PERIODIQUE*

L'oxydation, toujours effectuée en présence d'un grand excès d'acide periodique est réalisée à la température du laboratoire pendant une durée variable. L'acide est employé sous forme d'une solution décinormale (M/20) de periodate trisodique dans l'acide sulfurique dilué (Formule page 24).

Nous constituons chaque fois un témoin où de l'eau distillée est substituée à la solution oxydée.

a) *Détermination de la variation d'acidité.* — Après une durée d'oxydation variable, les acides organiques qui ont pris naissance ou disparu, sont titrés en présence de thymolphtaléine (cet indicateur virant de l'incolore au bleu de pH 9,3 à 10,5).

L'acide periodique se comporte comme un acide bivalent vis-à-vis de la thymolphtaléine. L'acide iodique qui en dérive réagit comme un acide monovalent. Il est donc indispensable de tenir compte de l'alcalinisation provoquée par la réduction de l'acide periodique pour calculer la quantité d'acides organiques qui prennent naissance ou bien disparaissent au cours de la réaction d'oxydation. Il est nécessaire de soustraire également l'acidité de l'essai témoin.

b) *Détermination de l'excès d'acide periodique.* — Nous utilisons la méthode de FLEURY et LANGE [55] à l'anhydride arsénieux. A la solution neutralisée par la soude, nous ajoutons 15 cm^3 d'anhydride arsénieux N/10, 1 cm^3 d'iodure de potassium à 20 p. 100 ; après contact de quinze minutes l'excès de solution arsénicale est titrée par l'iode N/10. La différence entre les quantités d'iode N/10 ajoutées dans l'essai et le témoin permet de déterminer la quantité d'acide periodique réduite par le corps et d'en déduire la quantité d'oxygène consommée par molécule.

c) *Dosage des aldéhydes formés.* — Nous appliquons la technique cyanimétrique, décrite par Mademoiselle R. BOISSON [15] ; dans la solution provenant des deux déterminations précédentes, nous mesurons 10 cm^3 de solution de bicarbonate de potassium pur à 20 p. 100 et 10 cm^3 de cyanure de potassium N/10 (M/20). Nous laissons en contact vingt-quatre heures à la glacière pour réduire la dissociation, toujours possible à la température ordinaire, des cyanhydrines formées. Dès que le flacon est retiré de la glacière, l'excès de cyanure de potassium est titré par une solution d'iode N/10 jusqu'à premier virage jaune pâle persistant quelques secondes après agitation. Ce dosage est effectué sans addition d'empois d'amidon.

Dans toutes nos oxydations par l'acide periodique, nous avons dosé l'acide phosphorique libéré sous l'action de cet oxydant. Nous

préparons donc un mélange réactionnel identique ; après contact, l'excès d'acide periodique est réduit par quelques gouttes de glycérol. Nous ajoutons alors 20 cm³ de mixture magnésienne et de l'ammoniaque en quantité suffisante pour obtenir le virage de la phénolphtaléine. Le phosphate ammoniaco-magnésien formé après repos de vingt-quatre heures est dosé par la méthode habituelle de COPAUX.

Au cours de nos essais, nous dénommerons phosphore alcalino-labile, l'acide libéré en une heure par séjour au bain-marie bouillant en milieu d'alcalinité sodique normale et phosphore orthophosphorique acido-labile, celui libéré dans les mêmes conditions dans un milieu d'acidité sulfurique normale. Nous avons déterminé ces deux formes de phosphore sur le liquide résultant de l'oxydation périodique additionnée de glycérol, puis après quelques minutes, soit de soude soit d'acide sulfurique 2N en quantités calculées pour obtenir la réaction du milieu désiré. Après chauffage l'acide phosphorique libéré est précipité sous forme de sel ammoniaco-magnésien puis dosé par la méthode de COPAUX.

II. — *OXYDATION PAR LE BROME EN MILIEU ALCALIN*

A la température du laboratoire, le brome en milieu alcalin apparaît comme un oxydant assez énergique des fonctions alcool secondaire.

Dans un flacon bouchant à l'émeri (1), nous mesurons successivement la solution d'ester (2) 10 cm³ de solution de brome (3), 10 cm³ de solution de bicarbonate de potassium à 20 p. 100, après contact convenable, à la température du laboratoire, nous titrons l'excès de brome par iodométrie. Le milieu est acidifié progressivement, en agitant, par 10 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100 pour éviter un

---

(1) Il est indispensable d'utiliser une verrerie rigoureusement propre. Nous la lavons avec le mélange sulfochromique, rinçons à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée.

(2) La plupart des esters étudiés ont été obtenus par précipitation ou cristallisation en présence d'éthanol. Ce corps est facilement oxydé par le brome. Il a par ailleurs été impossible d'en éliminer la totalité en maintenant les esters dans le vide sulfurique pendant plusieurs jours. C'est pourquoi nous évaporons à siccité au bain marie la solution neutre d'ester. Le résidu repris par l'eau est évaporé à nouveau et finalement redissous dans 10 cm³ d'eau distillée employée en plusieurs fois.

(3) *Solution N/10 de brome :*

Brome	8 gr.
Bromure de potassium	120 gr.
Eau q. s. p.	1000 cm³

Cette solution n'a pas besoin d'être ajustée ; car on procède à un essai témoin sans addition de substance à oxyder.

dégagement trop violent de l'anhydride carbonique libéré. Nous ajoutons alors 5 cm³ d'iodure de potassium à 20 p. 100. Nous attendons cinq minutes et dosons l'iode libéré par une solution N/10 d'hyposulfite de sodium.

Le virage étant très net, il n'est pas nécessaire d'opérer en présence d'empois d'amidon.

Sur cette liqueur ainsi neutralisée, il est possible de doser l'acide phosphorique libéré, il est précipité sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien et titré par la technique de COPAUX.

Deux autres séries de flacons sont préparés de la même façon pour doser le phosphore acido et alcalino-labile. Pour le phosphore acido-labile l'excès de brome est chassé par un courant d'air, nous ajoutons alors de l'acide sulfurique 2 N et opérons comme après oxydation periodique (page 27). Pour le phosphore alcalino-labile le brome est neutralisé par l'hyposulfite de sodium et à la solution alcalinisée par la soude nous ajoutons de la soude 2 N et opérons également comme après l'oxydation periodique (page 27).

III. — *OXYDATION NITROCHROMIQUE*

Les travaux de CORDEBARD [21] [22] ont montré que l'oxydation par le bichromate de potassium en milieu nitrique est bien plus sélective qu'en milieu sulfurique. Nous utilisons pour cette étude la même solution environ N/10 qui fut préconisée par F. POSTIC, J. COURTOIS et J. RABATE (1) [72] pour le dosage de l'alcool dans le sang. Cette solution doit être préparée quelques heures avant l'emploi, elle est de bonne conservation dans un flacon en verre jaune.

Nos solutions d'esters sont évaporées au bain-marie pour éliminer l'alcool et reprises par deux fois 5 cm³ d'eau distillée, nous les introduisons dans des flacons bouchant émeri très propres (notes 1 et 2, page 27) nous ajoutons alors 10 cm³ de solution nitrochromique N/10 et laissons se poursuivre la réaction pendant un temps plus ou moins long à la température du laboratoire.

Après oxydation convenable nous diluons le mélange réactionnel avec 40 cm³ d'eau distillée et ajoutons 5 cm³ d'iodure de potassium à 20 p. 100. Nous attendons cinq minutes et dosons l'iode libéré par l'hyposulfite de sodium N/10 en présence de quelques gouttes d'empois d'amidon jusqu'à virage du vert pâle au bleu franc.

(H. CORDEBARD [21] [22], D. COUSIN [33], J. COURTOIS et R. BARRÉ [30]).

---

(1) Bichromate de potassium pur . . . . . 4.90 gr.
Acide nitrique (D = 1.38) q.s.p. . . . . 1.000 cm³

Pour toutes ces opérations nous effectuons parallèlement un essai témoin, en remplaçant la solution d'ester par un volume égal d'eau distillée.

ETAT DU PHOSPHORE APRES OXYDATION NITROCHROMIQUE

L'acide phosphorique libéré est dosé par une technique adaptée de celle de M. FRANCOIS et E. BOISMENU [60]. Mais après action de la solution nitrochromique nous en réduisons l'excès par 1 cm^3 d'alcool à 95°, la coloration passe immédiatement de l'orangé au bleu. Nous diluons avec un peu d'eau et neutralisons partiellement par 2 cm^3 d'ammoniaque officinale. Après séjour de cinq minutes sur le bain-marie bouillant nous ajoutons alors 10 cm^3 de solution de molybdate d'ammonium à 10 p. 100, puis maintenons sur le bain-marie pendant 15 minutes.

Après repos de quelques heures, le précipité de phosphomolybdate d'ammonium jaune s'est déposé. Nous le recueillons sur un creuset de verre fritté et le lavons avec un peu d'alcool dilué. Nous versons sur le précipité 10 cm^3 d'ammoniaque dilué au demi et facilitons la dissolution à l'aide d'un agitateur à extrémité aplatie. La solution ammoniacale est aspirée doucement dans un tube à essai disposé sous le filtre, nous lui ajoutons 20 cm^3 de mixture magnésienne pour obtenir un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien dosé suivant la technique de COPAUX.

CHAPITRE III

Techniques de préparation des inositolphosphates étudiés au cours de ce travail.

L'inositolhexaphosphate a été utilisé sous forme de sel de sodium obtenu à partir des inositolhexaphosphates de calcium et de magnésium du commerce selon la technique de S. POSTERNAK. L'inositolpentaphosphate a été extrait des germes de Blé. Tous les esters mono-tri ou tétraphosphoriques ont été préparés après hydrolyse phytasique partielle de l'inositolhexaphosphate de sodium.

I. — *PRÉPARATION DE L'INOSITOLHEXAPHOSPHATE*

Nous avons suivi la technique décrite par S. POSTERNAK [66].

L'inositolhexaphosphate de calcium et magnésium est dissous dans l'acide chlorhydrique et précipité sous forme de phytinate de fer. Après élimination du fer à l'état d'hydroxyde ferrique par la lessive de soude à 33 p. 100 l'inositolhexaphosphate de sodium cristallise en présence d'alcool à la température du laboratoire.

TECHNIQUE. — Dans un grand mortier nous délayons 200 gr. d'inositolhexaphosphate de calcium et magnésium du commerce dans deux litres d'eau distillée ; nous ajoutons par petites fractions de l'acide chlorhydrique officinal jusqu'à ce que le sel soit totalement dissous (il est nécessaire d'en utiliser environ 95 cm^3). Le liquide opalescent obtenu est filtré sur papier. Nous ajoutons à ce moment quelques gouttes d'une solution de sulfocyanate de potassium à 10 p. 100, puis procédons ensuite à l'addition progressive de perchlorure de fer officinal. Il se forme un précipité abondant de phytinate de fer — nous arrêtons l'affusion de perchlorure de fer lorsque le liquide surnageant prend une coloration rouge sang. (La quantité de perchlorure de fer à ajouter s'est révélée variable suivant les échantillons d'inositolhexaphosphates commerciaux ; les quantités ajoutées varient entre 190 cm^3 et 300 cm^3). Le précipité est recueilli sur un filtre Büchner et lavé deux fois avec 100 cm^3 d'eau distillée. Ce précipté bien essoré est remis en suspension dans 500 cm^3 d'eau distillée et additionné goutte à goutte de lessive de soude ; nous

agitons constamment jusqu'à ce qu'une goutte portée sur un papier filtre donne un liseré incolore autour d'un point brun. Il est nécessaire d'utiliser environ 190 cm^3 de lessive de soude à 30 p. 100 en poids. Le précipité d'hydroxyde ferrique est recueilli sur un filtre Büchner, essoré, puis lavé avec de l'eau distillée, le filtrat qui doit être à peine coloré, est concentré par distillation sous vide jusqu'à 400 cm^3 environ. Nous ajoutons à cette liqueur de l'alcool à 90° jusqu'à obtention d'un louche persistant après agitation. Nous laissons alors reposer ; il se forme progressivement à la température du laboratoire des cristaux ; il est parfois nécessaire d'amorcer la cristallisation ; les cristaux recueillis, sont essorés et purifiés par redissolution dans l'eau et nouvelle recristallisation en milieu acoolique.

Ce sel forme deux hydrates l'un à 44 OH^2 se séparant à basse température et l'autre à 35 OH^2 obtenu par cristallisation à 20°. C'est ce dernier que nous avons obtenu régulièrement et utilisé pour nos essais (1).

II. — *PRÉPARATION DE L'INOSITOLPENTAPHOSPHATE*

Nous avons suivi la technique indiquée par S. et T. POSTERNAK [69] à laquelle nous apportons quelques légères modifications de détail.

Le principe de cette technique est le suivant : extraction par une solution acide à partir des germes de Blé stabilisés et précipitation de l'ester sous forme de sel de baryum insoluble.

Il est tout d'abord nécessaire d'inactiver la phytase des germes de Blé, qui pourrait hydrolyser le pentaphosphate ; nous portons à l'ébullition sous réfrigérant à reflux 3.500 cm^3 d'alcool à 90°. Nous y projetons alors le plus rapidement possible 1.000 gr. de germes de Blé deshuilés et maintenons l'ébullition pendant deux heures (2). Les germes sont ensuite essorés sur un filtre Büchner, desséchés, pendant 24 heures à l'étuve à 37°, puis finalement pulvérisés.

La poudre obtenue est traitée par 10 litres d'acide picrique à 4 p. 100 additionné de toluène. Après 48 heures de macération, nous filtrons et essorons soigneusement. Le filtrat opalescent est agité avec du talc et filtré à nouveau, afin d'obtenir un liquide parfaitement clair. Nous ajoutons alors 400 cm^3 d'acétate de baryum à

(1) Nous ne saurions manquer de remercier les Laboratoires CIBA qui mirent à notre disposition la majeure partie de l'inositolhexaphosphate de sodium nécessaire à la poursuite de ce travail. Qu'ils veuillent bien trouver ici notre hommage reconnaissant.

(2) Nous sommes heureux de remercier la firme U.C.L.A.F. qui nous a procuré grâce à l'obligeance de M. G. ARRAGON les quantités importantes de germes de blé utilisés.

20 p. 100 et laissons reposer vingt-quatre heures. Le précipité formé est recueilli, lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éliminer le maximum d'acide picrique ; nous redissolvons le précipité dans 500 cm³ environ d'acide chlorhydrique normal, puis ajoutons 100 cm³ d'acétate de baryum à 20 p. 100. Nous versons alors goutte à goutte 25 à 27 cm³ de lessive de soude jusqu'à l'obtention d'un précipité. Nous agitons mécaniquement pendant 30 minutes pour obtenir un mélange homogène et laissons en repos 24 heures à la température du laboratoire. Il se dépose un précipité abondant que nous recueillons et purifions par redissolution dans 100 cm³ d'eau distillée additionnée de 25 cm³ d'acide chlorhydrique officinal. Nous neutralisons à nouveau par de la lessive de soude en présence de 100 cm³ d'acétate de baryum à 20 p. 100. Le précipité formé est recueilli et essoré après 24 heures de repos.
Cette purification est répétée trois fois; finalement le corps obtenu est desséché dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant.

Selon S. et T. POSTERNAK, le corps obtenu possède la formule suivante :

$$(C_6\ H_{12}\ O_{21}\ P_5\ 2\ OH_2)^2\text{-}Ba_5 = 1907$$

Nous vérifions sa pureté en dosant ses principaux constituants : Phosphore — Baryum et Inositol d'après les techniques décrites dans la 1re partie chapitre II, page 21, et nous tenons compte surtout du rapport molécules d'acide phosphorique/molécules d'inositol.

Nous mentionnons les résultats obtenus pour différents échantillons dans le tableau n° 1.

TABLEAU N° I

ANALYSE DE DIVERS ÉCHANTILLONS D'INOSITOLPENTAPHOSPHATE

		Rendement p. 1.000 gr. de germes de blé	Baryum p. 100	Phosphore p. 100	Inositol p. 100	Molécules $PO_4\ H_3$ / Molécules Inositol
Théorie			35 92	16 25	18 87	5 0
Échantillon	I	21,5 g	37 03	16 43	18 57	5 1
	II	27,5 g	36 90	16 29	18 57	4 94
	III	24,5 g	37 04	15 90	18 15	4 96
	IV	24 g	36 57	15 73	17 90	4 91

Isolement des autres Inositolphosphates après hydrolyse phytasique partielle

Nous avons ensuite préparé après hydrolyse phytasique partielle de l'inositolhexaphosphate de sodium, les esters inositoltétra-tri-et monophosphoriques. Ce dernier a été obtenu difficilement, avec un mauvais rendement.

Nous n'avons pas préparé l'inositoldiphosphate, le rendement étant extrêmement faible et exigeant l'emploi de trop grosses quantités de matières premières.

Nous nous sommes adressés comme source de phytase au son de Blé (*Triticum Sativum*-Graminées) provenant d'un mélange de différentes variétés de Blé de l'année; nous l'avons utilisé sous forme d'une macération à 4 p. 100 dans de l'eau distillée toluénée. Le substrat est amené à pH 5,2.

D'autre part, étant donné le grand volume des solutions entrant en réaction, chacune d'elles est amenée à une température voisine de 37°. Nous déterminons alors le taux de phosphore total après calcination en présence de nitrate de magnésium, reprise du résidu par l'acide nitrique et dosage par la méthode de COPAUX.

Des prélèvements espacés où nous avons effectué le dosage du phosphore minéral libéré par hydrolyse, nous ont permis de surveiller la marche de la réaction.

Nous avons dû réaliser des hydrolyses phytasiques de plus longue durée que dans les essais de S. et T. POSTERNAK.

PRINCIPE. — Après une hydrolyse libérant 40 p. 100 environ de l'acide phosphorique estérifié du phytinate de sodium, l'inositoltétraphosphate est séparé sous forme de sel de baryum insoluble, il est purifié par précipitation du sel acide de baryum par l'alcool.

Une hydrolyse plus poussée, conduit à un mélange d'esters mono et triphosphoriques. Nous les séparons en nous basant sur la solubilité du sel de baryum de l'inositolmonophosphate et l'insolubilité de l'inositoltriphosphate de baryum.

III. — *PRÉPARATION DE L'INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE*

100 grammes d'inositolhexaphosphate de sodium à 35 OH_2 sont dissous dans 400 cm^3 d'eau, et amenés à pH 5,2 à l'aide d'acide acétique deux fois normal en présence de rouge de méthyle. La solution est additionnée de 250 cm^3 de solution tampon de pH 5,2 (acide acétique 2N 100 cm^3-soude N 150 cm^3) puis 2.500 cm^3 de macération de son de Blé à 4 p. 100 et complétée à 5 litres avec de l'eau distillée à laquelle nous ajoutons 5 cm^3 de toluène. Nous plaçons le ballon à l'étuve à 37°. Les déterminations effectuées au cours d'un essai préalable sur 1/100e de la dose nous montrent qu'après 27 heures, 35 p. 100 du phosphore total a été libéré par la phytase du son de Blé. Le contenu du ballon est alors filtré sur une couche de noir Norit et le filtrat est traité par 700 cm^3 d'acétate de baryum à 20 p. 100. Le précipité est recueilli après 24 heures, lavé et dissous dans

de l'acide chlorhydrique à 10 p. 100. Nous précipitons à nouveau par addition de 2/3 du volume d'alcool à 90°.

Dans ces conditions la plus grande partie du phosphate de baryum est soluble et seul précipite le sel acide de l'inositoltétraphosphate. Nous pratiquons deux autres purifications en redissolvant le corps obtenu dans l'acide chlorhydrique à 10 p. 100 et reprécipitation par l'alcool à 90°. Finalement le sel de baryum est lavé à l'eau puis à l'alcool et desséché.

Le produit obtenu répond selon S. et T. POSTERNAK à la formule suivante :

$$C_6\ H_{12}\ O_{18}\ P_4\ Ba_2,\ OH_2 = 788 \text{ gr.}$$

Pour l'identifier et contrôler sa pureté, nous avons dosé ses principaux constituants, les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 11.

TABLEAU II

ANALYSE DE DIVERS ÉCHANTILLONS D'INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE

		Rendement pour 100 gr. de sel de sodium	Baryum p. 100	Phosphore p. 100	Inositol p. 100	Molécules $Po_4\ H_3$ / Molécules Inositol
Théorie			34 77	15 72	22 84	4 0
Echantillon	I	16,0 g	32 51	13 92	19 40	4 06
	II	10,0 g	35 05	14 65	22 90	3 59
	III	12,50 g	31 95	13 90	19 00	4 13

Le rapport molécules d'acide phosphorique/molécules d'inositol indique que nous sommes bien en présence d'un inositoltétraphosphate.

IV. — *PRÉPARATION DES INOSITOLMONO ET TRIPHOSPHATE DE BARYUM*

Ces produits sont également préparés par hydrolyse diastasique de l'inositolhexaphosphate de sodium, mais après une hydrolyse libérant 70 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié. Le mélange obtenu contient les esters mono di et tri-phosphoriques de l'inositol.

300 grammes de phytinate de sodium à 35 OH_2 sont dissous dans 1.500 cm^3 d'eau distillée et amenés à pH 5,2 puis répartis dans trois ballons de 5 litres. Dans chaque ballon nous ajoutons 2.500 cm^3 de macération de son de Blé à 4 p. 100 et 250 cm^3 de solution tampon acide acétique-soude de pH 5,2. Après avoir complété à 5 litres avec de l'eau distillée, les récipients sont placés dans l'étuve à 37°. Nous déterminons la teneur en phosphore organique et nous suivons l'hydrolyse en dosant sur des prélèvements identiques l'acide phosphorique libéré. Après 57 heures il y a 70 p. 100 d'acide phosphorique

minéralisé, le contenu des ballons est alors filtré sur noir Norit, puis fortement alcalinisé par de l'ammoniaque. Nous ajoutons à l'ensemble des filtrats 2.100 cm³ d'acétate de baryum à 20 p. 100. Le précipité formé, renferme la totalité du phosphate de baryum et les inositol di et triphosphates de baryum. Le filtrat est conservé pour en extraire l'inositolmonophosphate.

a) ISOLEMENT DE L'INOSITOLTRIPHOSPHATE

Le précipité de sel de baryum recueilli sur filtre Büchner est lavé à l'eau distillée et redissous dans le minimum d'acide chlorhydrique officinal dilué au 1/10°. Nous précipitons par addition d'un demi volume d'alcool à 90°. Le précipité formé après 24 heures est soigneusement épuisé à l'eau distillée pour éliminer l'inositoldiphosphate. La fraction insoluble est remise en suspension dans l'eau distillée, nous ajoutons alors progressivement de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à complète dissolution, puis précipitons à nouveau par un demi volume d'alcool à 90°. Nous purifions une seconde fois par dissolution acide et reprécipitation alcoolique. Le produit est ensuite recueilli, lavé à l'eau et à l'alcool puis desséché dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant. Il répond d'après S. et T. POSTERNAK à la formule suivante :

$$(C_6\ H_{12}\ O_{15}\ P_3,\ OH_2)\ 2\ Ba_3 = 1281\ gr.$$

Les teneurs en chaque élément pour plusieurs de nos échantillons isolés sont mentionnés dans le tableau n° III et montrent que nous sommes en présence d'un inositoltriphosphate.

TABLEAU N° III

ANALYSE DE DIVERS ÉCHANTILLONS D'INOSITOLTRIPHOSPHATE

		Rendement pour 100 gr. phytinate de sodium	Baryum p. 100	Phosphore p 100	Inositol p. 100	Molécules $PO_4\ H_3$ / Molécules Inositol
Théorie			32 08	14 51	28 10	3 0
Echantillon	I	18,0 g	30 80	13 21	27 30	2 72
	II	25,0 g	31.50	13 50	27 65	2 75
	III	14,50 g	31 30	12 35	25 23	2 75

b) ISOLEMENT DE L'INOSITOLMONOPHOSPHATE

Le filtrat obtenu après alcalinisation par la baryte du produit d'hydrolyse phytasique pendant 57 heures est additionné de 500 cm³ d'acétate neutre de plomb à 20 p. 100. Le précipité est recueilli, mis en suspension dans 500 cm³ d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Le plomb est éliminé par un courant d'hydrogène sulfuré pendant

8 heures environ, tout en procédant à une agitation mécanique lente de la masse.

Le sulfure de plomb formé est laissé en repos pendant 24 heures et éliminé par filtration sur filtre Büchner.

Le filtrat est à nouveau traité par l'acétate neutre de plomb à 20 p. 100. Après décomposition du précipité plombique par le même procédé nous obtenons 260 cm^3 de filtrat. L'hydrogène sulfuré est chassé par barbottage d'un courant d'air, ce liquide est neutralisé par 20 grammes de baryte hydratée finement pulvérisée jusqu'à virage de la phénolphtaléine. Ce produit est concentré à 190 cm^3 par distillation sous vide et précipité par deux volumes d'alcool à 90°.

Il se forme un précipité extrêmement léger que nous devons recueillir par centrifugation. Le rendement n'a jamais dépassé deux grammes de sel de baryum, à partir de 300 grammes de phytinate de sodium.

Il n'a pas été toujours possible de procéder à une analyse de ce produit. Nous indiquons seulement dans le tableau IV la composition de l'un de nos échantillons qui nous servit à déterminer l'action de quelques préparations diastasiques sur ce substrat.

TABLEAU IV

ANALYSE D'UN ÉCHANTILLON D'INOSITOLMONOPHOSPHATE

	Rendement pour 1.000 gr. de phytinate de sodium	Phosphore p. 100	Inositol p. 100	Molécules $Po_4 H_3$ / Molécules d'Inositol
Théorie		6 62	38 46	1 0
Trouvé	6,00 g	5 10	37 95	0 75

DEUXIÈME PARTIE

ACTION DE DIVERS OXYDANTS SUR LES ESTERS HEXA-PENTA-TÉTRA ET TRIPHOSPHORIQUES DE L'INOSITOL

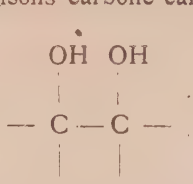
INTRODUCTION

En vue de pouvoir fixer la structure des inositolphosphates isolés, nous avons cherché à préciser leur comportement vis-à-vis de divers oxydants d'action plus ou moins sélective.

Notre choix a porté sur les réactifs suivants :

I. — ACIDE PERIODIQUE

Qui rompt assez sélectivement les fonctions α glycol et d'une façon plus générale les liaisons carbone-carbone possédant la structure :



MALAPRADE — P. FLEURY, d'après J. COURTOIS [27] [29].

II. — BROME, EN MILIEU BICARBONATÉ

Oxydant moins sélectif, qui parmi les différentes fonctions qu'il peut attaquer, oxyderait dans nos corps les fonctions alcooliques et de préférence les fonctions alcool secondaire.

III. — SOLUTIONS NITRIQUE DE BICHROMATE DE POTASSIUM

Réactif encore moins sélectif mais qui pouvait cependant nous fournir d'utiles indications. Nous avons précisé dans le chapitre II de la 1re partie, page 25, les conditions d'emploi de ces divers réactifs.

Nous indiquerons tout d'abord les résultats obtenus avec les divers corps étudiés (chapitres I, II, III, IV) ; nous ne procéderons qu'ensuite (chapitre V) à la discussion de ces résultats en comparant les comportements des divers corps.

CHAPITRE I

Action des divers oxydants sur les esters penta et hexa phosphoriques

Nous avons employé des solutions M/100 (en inositol) de ces deux esters. Celle d'inositolpentaphosphate a été obtenue en traitant le sel de baryum par un léger excès d'acide sulfurique titré, après une longue trituration au mortier de verre, suivie d'une agitation mécanique de deux heures, le sulfate de baryum est éliminé par filtration. Nous déterminons la teneur en acide phosphorique estérifié du filtrat, additionné des eaux de lavage et diluons de façon à obtenir une solution au titre voulu.

Nous avons préparé une solution M/100 (en inositol) d'inositolhexaphosphate en dissolvant dans de l'eau distillée son sel de sodium. La solution est titrée par dosage de l'acide phosphorique estérifié.

Les deux esters se sont montrés très stables en présence des agents d'oxydation utilisés.

a) *ACIDE PERIODIQUE*

Nous avons mis en contact 20 cm^3 d'inositolpentaphosphate M/100 (en inositol). 10 cm^3 de solution sulfurique de periodate de sodium N/10 et 1 cm^3 d'acide sulfurique N/1. Après une heure de contact à la température du laboratoire, nous observons une réduction de 0.05 molécule d'acide periodique par molécule d'ester. Cette réduction n'est pas augmentée après des durées de contact de 1-4-8 ou 30 jours.

L'oxydation periodique de certains corps est fonction de la réaction du milieu : P. FLEURY et J. COURTOIS [50] [51]. Nous avons obtenu des chiffres identiques avec une solution N/10 d'acide periodique libre (1) sans acidifier par de l'acide sulfurique. Il en a été de même avec la solution sulfurique à 20 p. 100 pour obtenir une acidité N/1, dans le mélange. Après chauffage de une heure sur le

(1) Obtenue en décomposant le periodate de baryum par la quantité théorique d'acide sulfurique.

bain-marie bouillant de l'inositolpentaphosphate avec la solution sulfurique de periodate de sodium, il n'y a que 0.15 molécule d'acide periodique réduit par molécule d'ester. Le léger accroissement de l'oxydation peut être attribué à une minime hydrolyse de l'ester.

D'autre part nous avons observé qu'à 100° dans les mêmes conditions, une molécule d'inositolhexaphosphate réduisait 0,10 molécule d'acide periodique.

A la température du laboratoire l'oxydation periodique de l'inositolhexaphosphate est pratiquement négligeable.

b) *BROME EN MILIEU BICARBONATÉ*

Les deux esters réduisent environ 0,3 atome de brome après contact de 2, 4 ou 8 jours à la température du laboratoire, parallèlement il n'y a mise en liberté que de quantités insignifiantes d'acide orthophosphorique.

c) *SOLUTION NITRO-CHROMIQUE*

En 2, 4 ou 8 jours, l'inositolpentaphosphate fixe environ 0,2 atome d'oxygène à la température du laboratoire ; l'action réductrice de l'inositolhexaphosphate est encore inférieure, à 100° l'ester hexaphosphorique consomme environ 0.5 atome d'oxygène après une heure de chauffage. Dans les mêmes conditions l'ester pentaphosphorique en fixe 0,6 atome. Cette oxydation semble porter sur les corps formés par hydrolyse acide de ces esters.

CONCLUSIONS

De l'ensemble de ces essais, nous pouvons retenir, en vue de la discussion générale, le fait que les esters penta et hexaphosphoriques de l'inositol ne sont attaqués que d'une façon insignifiante par les trois oxydants. Comme il était à prévoir l'inositolpentaphosphate est un peu plus facilement oxydable que l'inositolhexaphosphate.

CHAPITRE II

Action des divers oxydants sur l'acide inositoltétraphosphorique.

Nous avons utilisé une solution M/100 (en inositol) obtenue à partir du sel de baryum en éliminant cet élément comme au chapitre précédent (page 41). Des essais identiques ont été réalisés sur deux échantillons d'inositoltétraphosphate obtenus au cours de préparations distinctes, ils ont fourni des résultats semblables.

TABLEAU V

OXYDATION PERIODIQUE DE L'INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

(Les résultats sont rapportés à une molécule d'ester)

Echantillon	Durée d'oxydation (en jours)	Variation d'acidité (exprimée en molécules d'acide monovalent apparu ou disparu)	Molécules d'acide periodique réduites	Molécules d'aldehyde libérées (1)	Molécules d'acide phosphorique libérées	Molécules d'acide phosphorique acido labile (2)	Molécules d'acide phosphorique alcalino labile
I	1	+ 0 50	0 10	0 07	0 07	0 21	0 28
	2	+ 0 50	0 35	0 12	0 35	0 35	0 50
	4	+ 0 50	0 52	0 25	0 50	0 42	0 57
	6	+ 0 50	0 60	0 25	0 71	0 50	0 71
	8	+ 0 50	0 80	0 25	0 85	0 71	0 85
II	1	+ 0 65	0 12	0 10	0 10	0 25	0 35
	2	+ 0 65	0 37	0 20	0 39	0 42	0 57
	4	+ 0 65	0 54	0 25	0 57	0 50	0 71
	6	+ 0 65	0 64	0 25	0 78	0 57	0 78
	8	+ 0 65	0 82	0 25	0 89	0 75	0 89

(1) Nous exprimons les produits réducteurs titrés par cyanimétrie en molécules d'aldéhyde, sans préjuger de leur nature aldéhydique ou cétonique.

(2) Résultats exprimés en molécules d'acide phosphorique libérées, soustraction faite de celui libéré au cours de l'oxydation periodique.

a) *ACIDE PERIODIQUE*

Nous mettons en contact à la température du laboratoire 20 cm^3 de solution d'ester M/100 (en inositol), 10 cm^3 de solution sulfurique de periodate de sodium N/10 et 1 cm^3 d'acide sulfurique N/1. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau V (page 43).

L'oxydation periodique se poursuit très lentement en fonction du temps, la quantité de substances réductrices n'augmente plus après 2 jours comme si l'oxydant transformait autant de substance réductrice qu'il s'en forme à partir de l'ester.

L'oxydation periodique s'accompagne d'une libération progressive de l'acide phosphorique estérifié et d'une augmentation parallèle du phosphore acido ou alcalino-labile qui apparaissent en quantités assez voisines.

Ce comportement de l'acide periodique diffère nettement de celui habituellement observé avec les corps facilement oxydables. Nous nous réservons de revenir sur ces résultats lors de la discussion générale.

b) *BROME EN MILIEU BICARBONATÉ*

Avec 5 cm^3 d'ester M/100 (en inositol) nous n'avons noté qu'une oxydation minime, même après des durées de contact de 8 et 10 jours à la température du laboratoire.

c) *SOLUTION NITRIQUE DE BICHROMATE DE POTASSIUM*

Nous avons opposé 5 cm^3 de solution d'ester M/100 (en inositol) à 10 cm^3 de solution nitrique de bichromate de potassium environ N/10. L'oxydation est beaucoup plus importante qu'avec les esters penta ou hexaphosphoriques de l'inositol (tableau VI).

TABLEAU VI

OXYDATION NITROCHROMIQUE DE L'INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE (1)

Durée d'oxydation	3 h	4 h	5 h	8 h	1 J	2 J	4 J
Atomes d'oxygène consommés par molécule d'ester	2,5	2,75	3,00	3,25	3,50	3,50	3,50

(1) Les mêmes essais effectués sur un second échantillon obtenu au cours d'une préparation différente ont fourni des résultats sensiblement identiques.

Cette oxydation apparaît être terminée après 8 heures et s'accompagne d'une libération de 2,5 molécules de l'acide phosphorique estérifié.

CONCLUSIONS

L'ester tétraphosphorique n'est pas oxydé par le brome, il l'est assez rapidement par la solution nitrochromique, mais la consommation d'oxygène est assez minime pour un composé hexacarboné.

L'oxydation periodique est très lente et progressive et ne s'effectue pas avec la régularité observée avec les corps facilement oxydables.

CHAPITRE III

Action des divers oxydants sur l'acide inositoltriphosphorique

Les essais sont analogues à ceux réalisés avec l'ester tétraphosphorique.

a) *ACIDE PERIODIQUE*

Son action est aussi lente qu'avec l'inositoltétraphosphate, mais elle est beaucoup plus accentuée. L'allure générale de la réaction est cependant identique (Tableau VII).

TABLEAU N° VII

OXYDATION PERIODIQUE DE L'INOSITOLTRIPHOSPHATE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

(Les résultats sont rapportés à une molécule d'ester)

Echantillon	Durée d'oxydation en jours	Variation d'acidité exprimée en molécules d'acide monovalent apparu ou disparu	Molécules d'acide periodique réduites	Molécules d'aldéhyde libérées (1)	Molécules d'acide phosphorique libérées	Molécules d'acide phosphorique acido labile (2)	Molécules d'acide phosphorique alcalino labile
I	1	+ 0.62	0.42	0.27	0.35	0.28	0.50
	2	+ 0.62	0.80	0.50	1.00	0.64	1.21
	4	+ 0.62	1.15	0.50	1.35	1.00	1.35
	6	+ 0.62	1.45	0.50	2.07	0.71	0.85
	8	+ 0.62	1.57	0.50	2.16	0.85	0.75
II	1	+ 0.67	0.47	0.30	0.42	0.28	0.57
	2	+ 0.67	0.82	0.50	0.78	0.35	0.89
	4	+ 0.67	1.10	0.55	1.14	0.50	1.21
	6	+ 0.67	1.47	0.55	1.64	0.64	1.07
	8	+ 0.67	1.75	0.55	1.71	0.85	1.10

(1) Nous exprimons les produits réducteurs titrés par cyanimétrie en molécules d'aldéhyde sans préjuger de leur nature aldéhydique ou cétonique.

(2) Résultats exprimés en molécules d'acide phosphorique libérées, soustraction faite de celui libéré au cours de l'oxydation périodique.

Après 2 jours la quantité de substances réductrices n'augmente plus, tandis que par contre la réduction de l'acide periodique et la libération de l'acide phosphorique estérifié continuent de s'accroître. Après 8 jours l'acide phosphorique estérifié, se retrouve en totalité partie sous forme libérée et en partie sous forme acido et alcalino-labile.

b) *BROME EN MILIEU BICARBONATÉ*

L'oxydation est insignifiante aussi bien après 8 jours de contact, qu'en faisant varier les proportions respectives de triphosphate et de solution bromée.

c) *SOLUTION NITRIQUE DE BICHROMATE DE POTASSIUM*

Les résultats du tableau VIII indiquent que ce corps est oxydé plus complètement que l'inositoltétraphosphate.

TABLEAU N° VIII

OXYDATION NITROCHROMIQUE DE L'INOSITOLTRIPHOSPHATE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

Phosphatillon	Durée d'oxydation	1 h	2 h	3 h	4 h.	5 h	18 h	1 j	2 j	4 j	6 j	8 j
I	Atomes d'oxygène consommés par molécule d'ester							7,3	7,5	10,1	10,1	10,1
II		4.0	5.0	6.5	7.25	7.75	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

10 atomes d'oxygène sont fixés au cours de la réaction avec mise en liberté de 2,5 molécules d'acide phosphorique. A la température du bain marie bouillant l'oxydation est bien plus poussée et une molécule d'inositoltriphosphate consomme en 3 heures 11,40 atomes d'oxygène, il y a donc eu oxydation presque complète de la fraction carbonée de l'ester, probablement à la suite de l'hydrolyse des produits intermédiaires de l'oxydation.

CONCLUSIONS

L'inositoltriphosphate n'est pas oxydé par le brome. Il est attaqué par l'acide periodique d'une façon similaire à celle de l'inositoltétraphosphate, mais la réaction est plus poussée, enfin la solution nitro-chromique l'attaque plus profondément que l'inositoltétraphosphate.

CHAPITRE IV

Action des oxydants sur quelques polyols dérivant du cyclohexane.

Les esters phosphoriques de l'inositol étudiés se sont révélés être plus ou moins résistants à l'action des oxydants utilisés. Cette résistance n'a pas été sans nous surprendre, c'est pourquoi avant d'interpréter les données analytiques, nous avons étudié à titre comparatif divers glycols dérivant du cyclohexane.

Certains de ces corps avaient déjà été soumis à l'action de l'acide periodique. Nous décrirons tout d'abord les résultats relevés dans la littérature puis ensuite nos essais personnels.

ACTION DE L'ACIDE PERIODIQUE SUR LES GLYCOLS DÉRIVANT DU CYCLOHEXANE

Nous décrivons les résultats obtenus avec le cyclohexanediol et l'inositol dans l'étude complémentaire des deux autres oxydants sur ces corps.

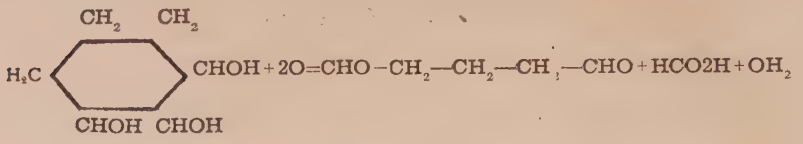
1) CYCLOHEXANETRIOLS

T. Posternak et F. Ravenna [71] ont montré que les trois cyclohexanetriols 1, 2, 3 stéréoisomères sont rapidement oxydés par l'acide periodique. Ces trois stéréoisomères sont cependant oxydés à des vitesses inégales, la forme α qui ne possède pas deux oxhydriles voisins dans le même plan est oxydée plus lentement que son stéréoisomère β qui possède deux oxhydriles contigus situés du même côté du plan de la molécule. Enfin la forme γ où les trois oxhydriles sont disposés en cis est la plus rapidement oxydée des trois.

α β γ

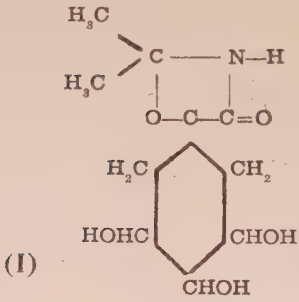
A la température du laboratoire, après 40 minutes de contact avec une solution sulfurique de periodate, la forme α a réduit 0,65 molé-

cule de periodate, les formes β et γ 1,19 molécules. L'oxydation complète s'accompagne de la réduction de 2 molécules d'oxydant et demande 17 heures 30 minutes pour la forme α. Ainsi donc les cyclohexanetriols sont oxydés assez rapidement comme le prévoit la règle de MALAPRADE, FLEURY selon l'équation.

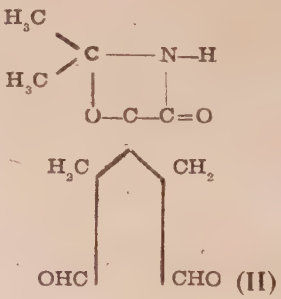


II) DERIVES DE L'ACIDE QUINIQUE

H. FISCHER et G. DANGSCHAT [39] ont signalé qu'en 1 heure en milieu aqueux l'acide periodique oxydait la cétone-amide de l'acide quinique (I), deux molécules d'oxydant sont réduites avec formation de une molécule d'acide formique et du dialdéhyde (II).



(I)

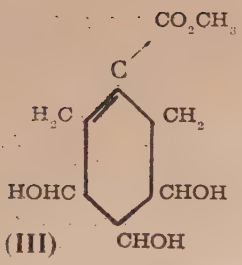


(II)

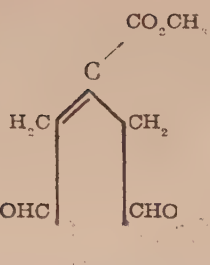
Ce dernier fut oxydé par le brome en cétone-amide de l'acide citrique identifié après hydrolyse bromhydrique du groupement cétone-amide.

L'ester méthylique de l'acide shikimique (anhydro-quinique (III) est oxydé en milieu aqueux par l'acide periodique. FISCHER et DANGSCHAT [41]. A la température du laboratoire, en trente minutes, les trois oxhydriles contigus réduisent deux molécules d'acide periodique pour donner naissance à une molécule d'acide formique et une de dialdéhyde (IV).

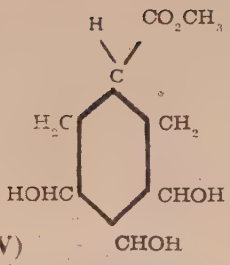
Ces deux auteurs [40] ont également oxydé rapidement (15 minutes) les trois fonctions alcooliques contigues du méthylester de l'acide shikimique hydrogéné (V).



(III)

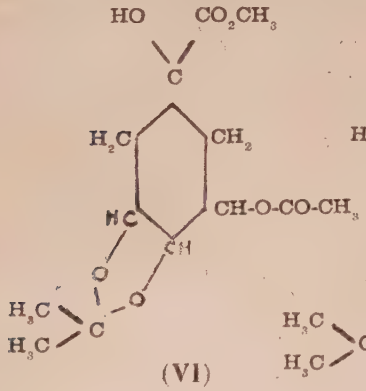


(IV)

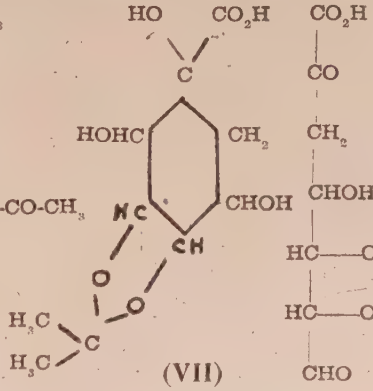


(V)

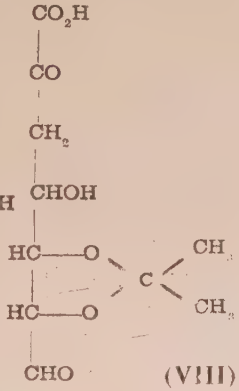
FISCHER et DANGSCHAT [42] oxydent par le permanganate un dérivé monoacétylé de l'ester méthylique de l'acide isopropylidène shikimique et obtiennent le dérivé monoacétylé de l'ester méthylique de l'acide 1-oxyshikimique (VI). Les groupements ether-sels sont saponifiés par la soude ; le corps obtenu (VII) possède une fonction alcool secondaire et une fonction alcool tertiaire contigues. Cette liaison est rompue par une solution sulfurique de periodate à la température du laboratoire pour donner le composé (VIII).



(VI)



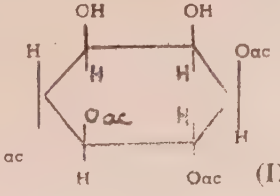
(VII)



(VIII)

III) TÉTRACÉTYLINOSITOL

DANGSCHAT G. [34] acétyle le mono-acétone inositol en tétracétyl-isopropylidène inositol, ce dernier par chauffage en solution acétonique en présence d'acide chlorhydrique étendu conduit au trétacétyl-mésoinositol (IX).



(IX)

Ce corps s'est montré indifférent vis-à-vis de l'acide periodique en solution acétique, à froid. C'est à notre connaissance, le seul cas d'un glycol α, à noyau cyclohexanique qui n'ait pas été oxydé par l'acide periodique. Il convient cependant d'observer que cet oxydant a été utilisé en solution acétique, bien que jusqu'ici les auteurs ayant utilisé ce solvant n'aient pas signalé de différences entre les solutions aqueuses et les solutions acétiques d'acide periodique.

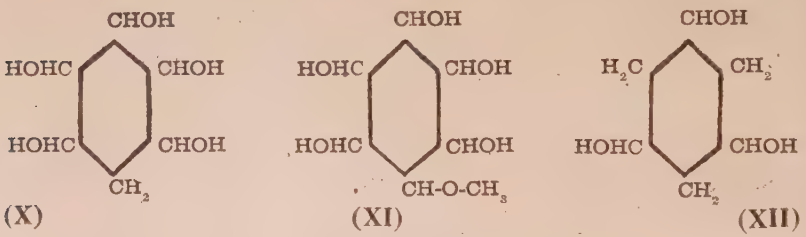
Le tétracétylinositol est par contre oxydé en tétraldéhyde par le tétracétate de pomb, dont les propriétés oxydantes sont très voisines de celles de l'acide periodique.

IV) CYCLITOLS DIVERS

Mme Fiévet [38] a observé qu'après 8 jours de contact à 15° divers polyols cycliques dont les formules se rapprochent de celle de l'inositol étaient profondément oxydés par l'acide periodique.

Le viburnitol et le quercitol de structure X réduisent 7,9 molécules d'oxydant. Le pinitol et le québrachitol isomères (XI) en réduisent 7 molécules environ.

Enfin, le phloroglucitol (XII) qui ne possède pas de groupement α glycol, mais des fonctions alcool secondaire séparées par des groupements CH_2 en réduit 12,5 molécules.



V) TÉTRAHYDROTERRÉINE

La tétrahydroterréine, produit de réduction de la terréine d'*Aspergillus*, possède une fonction α glycol dans un cycle carboné pentagonal. Elle est oxydée par l'acide periodique selon schéma suivant : Clutterbuck et Reuter [20] :

Il ressort donc de ces deux essais que l'acide periodique en solution aqueuse a oxydé facilement et rapidement les α glycols dérivant

du cyclohexane. Par contre l'acide periodique en solution acétique n'a pas scindé la fonction glycol du tétracétylinositol, celui de ces divers dérivés du cyclohexane qui présente la plus grande analogie avec les esters inositolphosphoriques étudiés.

ACTION DES TROIS OXYDANTS SUR QUELQUES DÉRIVÉS DU CYCLOHEXANE

Nous avons déterminé comparativement l'action des trois réactifs oxydants utilisés pour l'étude des inositolphosphates sur l'inositol, le cyclohexanediol, l'acide quinique. De plus, nous avons également réalisé des essais avec une dicétone dérivant du cyclohexane : la diméthylcyclohexanedione ou dimédon.

I. — ESSAIS AVEC L'INOSITOL

a) *Acide periodique* . — P. Fleury et J. Lange, puis P. Fleury, G. Poirot et M^me^ Fiévet [57] ont étudié d'une façon très complète l'oxydation periodique de ce polyol. Nous nous bornerons à résumer succinctement leurs résultats.

Dans une première phase d'allure rapide (quelques minutes à la température ordinaire), il y a rupture du noyau et vraisemblablement formation de deux molécules d'aldéhyde hydroxypyruvique $CH_2OH — CO — CHO$; ce dernier est oxydé rapidement en acide glycolique et acide formique. Cette première partie de l'oxydation peut se représenter par le schéma :

$$(CHOH)_6 + 4O = 2\ HCO_2H + 2\ CH_2OH — CO_2H$$

Une seconde phase bien plus lente (4 jours environ) lui succède, elle se caractérise par une oxydation incomplète de l'acide glycolique en acide formique et anhydride carbonique. La quantité totale d'oxygène consommé est d'environ 6,7 atomes par molécule d'inositol.

b) *Brome en milieu bicarbonaté.* — Nous avons utilisé 2 cm^3^ de solution d'inositol M/100. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IX.

TABLEAU N° IX

OXYDATION DE L'INOSITOL A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE PAR LE BROME EN MILIEU BICARBONATÉ

(Les résultats sont rapportés à une molécule d'inositol.)

Durée d'oxydation	4 h	7 h	24 h
Atomes de Brome consommés par molécule d'Inositol	8 5	12 00	17 00

Le brome en milieu bicarbonaté oxyde rapidement l'inositol, il est probable que la réaction s'effectue selon l'équation.

$$(CHOH)^6 + 24\ Br + 6\ OH_2 = 6\ CO_2 + 24\ BrH$$

Après 24 heures il n'y a eu que 17 atomes de brome réduits (théorie 24), mais nous devons tenir compte du fait que le potentiel oxydant du brome en milieu bicarbonaté diminue assez rapidement (transformation de l'hypobromite en bromate). Au cours des oxydations par l'hypobromite tout comme avec l'hypoïodite, un corps à oxyder qui n'est pas transformé très rapidement reste toujours incomplètement oxydé.

c) *Solution nitrique de bichromate de potassium.* — Nos essais (tableau X), ont été réalisés en faisant réagir 10 cm^3 de solution nitrochromique N/10 sur 2 cm^3 de solution d'inositol M/100. L'oxydation, très rapide, est terminée après 5 heures, elle est totale et peut être représentée par l'équation.

$$(CH\ OH)^6 + 6\ O_2 = 6\ CO_2 + 12\ \ OH_2$$

TABLEAU X

OXYDATION NITROCHROMIQUE DE L'INOSITOL A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

(Les résultats sont rapportés à une molécule d'inositol.)

Durée d'oxydation (en heures)	2	3	4	5	24	48	72
Atomes d'oxygène consommés par molécule d'Inositol	10 0	10 75	11 37	12 00	12 00	12 00	12 00

A la température du bain-marie bouillant 12,2 atomes d'oxygène sont consommés après 10 minutes.

Il ressort de ces essais que l'inositol est oxydé rapidement et assez complètement par les trois réactifs utilisés.

II. — ESSAIS SUR LE CYCLOHEXANEDIOL

Nous avons utilisé l'isomère *cis*. P. F. 102° (théorie 104°).

TABLEAU XI

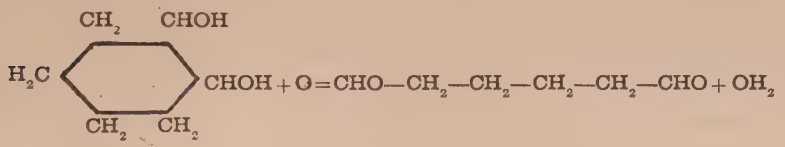
OXYDATION PERIODIQUE DU CYCLOHEXANE-DIOL 1. 2. CIS

(Les résultats sont rapportés à une molécule de corps.)

Acide monovalent disparu (en molécules)	Molécules d'acide periodique consommées	Molécules d'aldéhyde formées
0 50	0 85	1 52

a) *Acide periodique.* — Les essais (tableau XI) ont été réalisés avec 20 cm³ de cyclohexanediol M/100. L'oxydation est un peu inférieure à ce que l'on pouvait prévoir, elle s'arrête après 1 heure et reste sans changement après 1, 2 et 3 jours de contact.

D'après la réaction :



il n'y a en effet que 0,85 molécule d'acide periodique réduit (théorie 1,0 molécule) et il se forme 1,52 fonction aldéhydique au lieu de 2,0. L'oxydation periodique complètement terminée après 24 heures est très rapide car PRICE et KROLL [73] avaient constaté qu'elle était déjà réalisée après 10 minutes.

b) *Brome en milieu bicarbonaté.* — Nous avons réalisé cette étude avec 5 cm³ de solution M/100 de cyclohexanediol (tableau XII).

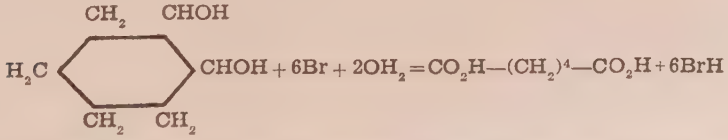
TABLEAU XII

OXYDATION PAR LE BROME DU CYCLOHEXANEDIOL 1. 2. CIS A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

(Les résultats sont rapportés à une molécule de glycol)

Durée d'oxydation (en heures)	1	2	3 30	4	8	24
Atomes de brome consommés	2 20	3 80	4 00	4 60	6 00	6 00

L'oxydation s'effectue rapidement et est terminée après 8 heures, elle peut être représentée par l'équation.



Il se formerait donc, après ouverture du cycle, de l'acide adipique.

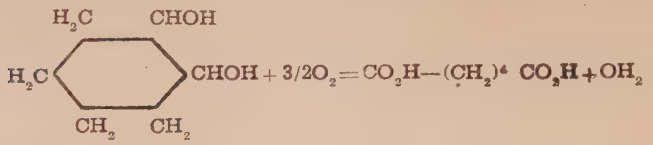
c) *Solution nitrique de bichromate de potassium.* — 5 cm³ de solution M/100 de cyclohexanediol ont été mis en contact avec la solution nitrochromique, à la température du laboratoire (tableau XIII).

TABLEAU N° XIII

OXYDATION NITROCHROMIQUE DU CYCLOHEXANE-DIOL
A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

Durée d'oxydation (en heures)	3	4	5	8	20	22	37
Atomes d'oxygène consommés par molécule de cyclohexane-diol	2 5	2 75	2 75	3 00	3 00	3 00	3 00

La réaction très rapide paraît être terminée après 8 heures et conduire également à la formation d'acide adipique.



De ces essais, il ressort que le cyclohexanediol est oxydé rapidement et complètement en acide adipique soit par le brome en milieu bicarbonaté, soit par la solution nitrochromique. L'acide periodique, agit également d'une façon rapide, mais, pour des causes que nous n'avons pu déterminer, la réaction est incomplète.

III. — ESSAIS AVEC L'ACIDE QUINIQUE

a) *Acide periodique*. — L'oxydation est très rapide (tableau XIV) elle paraît s'effectuer principalement selon l'équation suivante :

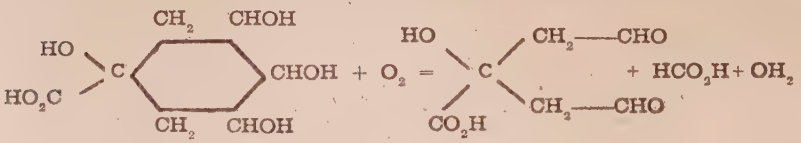


TABLEAU N° XIV

OXYDATION PERIODIQUE DE L'ACIDE QUINIQUE

(Les résultats sont rapportés à une molécule de corps.)

Durée d'oxydation (en heures)	Variations d'acidité	Molécules d'acide periodique réduites	Molécules de produits réducteurs formées
15 minutes	0	2 20	1 50
1	0	2 20	1 50
3	0	2 20	1 50
12	0	2 20	1 50
24	0	2 20	1 50

La quantité d'acide periodique réduit (2,2 molécules) est un peu supérieure à la théorie (2 molécules). Par contre, les substances aldéhydiques dosées par le cyanure accusent un déficit (1,5 molécule d'aldéhyde au lieu du chiffre théorique de 2,0).

Il est possible que le cyanure se combine d'une façon incomplète au dialdéhyde formé.

Les dialdéhydes complexes formés par oxydation periodique ne réagissent pas toujours quantitativement avec les réactifs des aldéhydes M^lle^ VALENTINO [78] J. COURTOIS (Recherches inédites).

Nous pensons en effet que l'acide quinique est bien oxydé selon l'équation indiquée (page 56). FISCHER et DANGSCHAT [39] ont pu identifier les dialdéhydes formés par oxydation periodique de dérivés de l'acide quinique ou de l'acide shikimique qui en dérivent. Cette identificaton fut réalisée en oxydant par le brome les dialdéhydes en diacides.

Nous pouvons également faire une autre remarque : le dialdéhyde dérivant de l'acide quinique ne paraît pas être oxydé par l'acide periodique. P. FLEURY et J. COURTOIS [50] [51] ont en effet montré que certains corps possédant un groupement CH_2 situé entre deux groupements fortement électronégatifs sont attaqués par l'acide periodique : acide malonique, semialdéhyde malonique.

Par ailleurs, J. COURTOIS (recherches inédites) a observé que l'acide citrique était oxydé lentement et régulièrement par l'acide periodique, il est à noter que le dialdéhyde correspondant à l'acide citrique ne paraît pas être attaqué au cours des premières 24 heures dans nos conditions opératoires.

b) *Brome en milieu bicarbonaté.* — L'oxydation bromée (tableau XV) débute immédiatement et se poursuit progressivement.

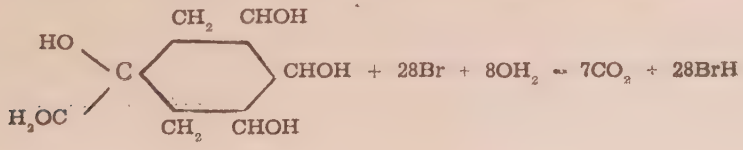
TABLEAU N° XV

OXYDATION PAR LE BROME EN MILIEU BICARBONATÉ DE L'ACIDE QUINIQUE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

(Les résultats sont rapportés à une molécule d'acide quinique.)

Durée d'oxydation	15 m	30 m	4 h	8 h	1 j	2 j	3 j
Atomes de brome consommés	10 00	13 00	15 60	18 50	20 50	22 00	24 00

Elle paraît tendre vers une oxydation totale selon l'équation.



Comme nous l'avons déjà signalé, le potentiel oxydant du brome en milieu bicarbonaté, diminue avec le temps, c'est ce qui expliquerait le ralentissement observé dans la marche de l'oxydation, ainsi que son caractère incomplet (réduction en 3 jours de 24,0 atomes de brome, l'oxydation complète en exigeant 28,0 atomes).

c) *Solution nitrique de bichromate de potassium.* — Cette oxydation est rapide (tableau XVI)

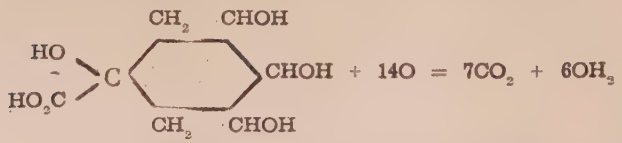
TABLEAU XVI

OXYDATION NITROCHROMIQUE DE L'ACIDE QUINIQUE A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

(Les résultats sont rapportés à une molécule de corps.)

Durée d'oxydation	15 m	30 m	4 h	8 h	1 j	2 j	3 j
Atomes d'oxygène consommés	7 00	8 25	12 00	12 50	13 00	13 00	13 00

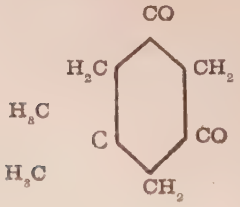
et paraît s'effectuer selon l'équation :



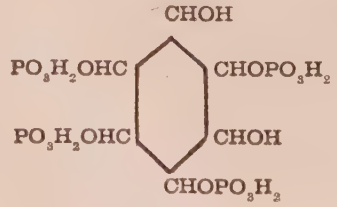
Après 24 heures une molécule d'acide quinique a déjà réduit 13 atomes d'oxygène (théorie 14.0). Cette oxydation n'est cependant pas absolument complète, car la réaction paraît terminée après 24 heures.

IV. — ESSAIS AVEC LE DIMÉDON

Le dimédon est la diméthyl - 5 - 5 - cyclohexanedione 1-3 de formule A.



- A -



- B -

Ce corps ne possède pas de fonction α glycol. Mais deux fonctions cétoniques disposées en méta. Lorsque les fonctions cétoniques sont contigües, la substance est oxydable par l'acide periodique (Mme FIÉVET [38] J. COURTOIS [27] [29]).

Nous avons jugé cependant intéressant, d'étudier l'action des oxydants sur un corps possédant deux fonctions oxygénées, séparées par un radical CH_2 et qui présentait une certaine analogie de structure avec un inositolphosphate à fonctions alcooliques libres disposées en méta du type B.

a) *Acide periodique.* — L'oxydation est lente et irrégulière (tableau XVII), l'interprétation des résultats paraît assez difficile.

TABLEAU XVII

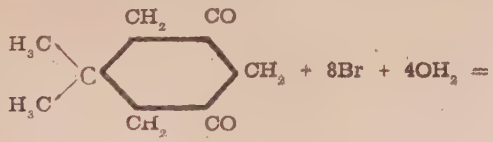
OXYDATION A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE DU DIMÉDON PAR UNE SOLUTION SULFURIQUE DE PERIODATE DE SODIUM

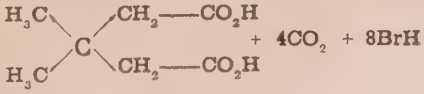
(Les résultats sont rapportés à une molécule de dimédon.)

Durée d'oxydation (en heures)	1	2	3	5	24	96
Molécules d'acide periodique réduites	1 07	1 15	1 30	1 37	1 87	2 67

b) *Brome en milieu bicarbonaté.* — Une molécule de dimédon réduit 8 atomes de brome, aussi bien après 5 minutes, qu'après plusieurs jours.

Il est possible d'envisager une oxydation en acide diméthyl —3— glutarique selon le schéma.





c) *Solution nitrique de bichromate de potassium.* — Avec 2 cm^3 de solution M/100 de dimédon, il y a eu consommation de 6,55 atomes d'oxygène par molécule de dimédon, ceci après des durées de contact de 1-2-3-4-5-6-24 et 96 heures.

Il nous paraît difficile de proposer un schéma pour cette oxydation.

CONCLUSIONS

I. — Les données de la littérature et nos expériences personnelles indiquent que les composés possédant au moins un groupement

α glycol dans le cycle du cyclohexane sont oxydés rapidement et en général d'une façon complète par l'acide periodique en solution aqueuse.

Nous n'avons relevé qu'une exception : le tétracétylinositol dont la fonction α glycol n'est pas oxydée par une solution acétique d'acide periodique. DANGSCHAT [34].

II. — Le cyclohexanediol 1-2, l'inositol, l'acide quinique et le diméthon sont oxydés assez rapidement et d'une façon presque complète par le brome en milieu bicarbonaté.

III. — Les mêmes corps sont oxydés en général d'une façon plus rapide et plus complète par la solution nitrique de bichromate de potassium.

CHAPITRE V

Discussion des résultats fournis par l'action des divers oxydants sur les inositolphosphates et les polyols dérivant du cyclohexane.

Nous envisageons séparément le comportement des trois réactifs oxydants. Contre toute attente, c'est l'acide periodique, dont l'action aurait dû être la plus spécifique, qui a fourni les résultats les plus délicats à interpréter. Nous ne les discuterons qu'en dernier lieu ; nous étudierons tout d'abord les résultats les plus significatifs; en premier examen, ceux fournis par le brome en milieu bicarbonaté.

A. — *ACTION DU BROME EN MILIEU BICARBONATÉ*

Dans le tableau XVIII, nous avons réuni les principaux faits mis en évidence par action de ce réactif.

TABLEAU XVIII

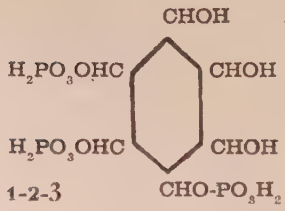
ACTION DU BROME EN MILIEU BICARBONATÉ SUR DIVERS DÉRIVÉS DU CYCLOHEXANE

Corps étudié	Inositol hexa-phosphate	Inositol penta-phosphate	Inositol tetra-phosphate	Inositol tri-phosphate	Inositol	Cyclo-hexane-diol	Acide quinique	Dimédon
Atomes de brome réduits par molécule de corps	0 3	0 3	infime	infime	17 0	6 0	24 0	8 0
Allure de la réaction	Oxydation infime	Oxydation infime	Oxydation infime	Oxydation infime	Oxydation rapide et presque totale	Oxydation très rapide et complète	Oxydation rapide et presque totale	Oxydation très rapide et probablement complète

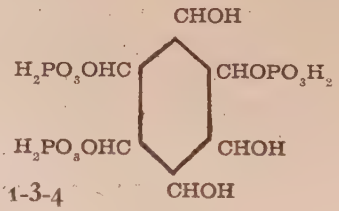
L'examen de ce tableau est à première vue très significatif. Il permet d'opposer deux groupes de corps, d'un côté les esters phosphoriques de l'inositol dont l'oxydation est insignifiante, de l'autre les glycols dérivant du cyclohexane et le dimédon oxydés assez rapidement et d'une façon profonde.

Pour l'inositoltriphosphate, il paraît donc presque certain, que ce corps ne possède pas la structure 1-2-3 où les trois fonctions alcooliques libres sont contiguës. La possibilité de voir deux fonctions alcooliques libres contiguës dans le triphosphate (structure 1-2-4) ou dans le tétraphosphate (structure 1-2) apparaît assez douteuse.

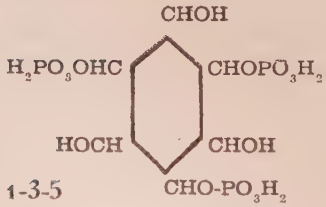
On peut envisager que les esters tri et tétraphosphoriques de l'inositol ne possèdent pas de fonctions alcooliques contiguës et présenteraient respectivement les structures 1-3-5 et 1-3 ou 1-4. Le fait que l'oxydation reste aussi minime avec l'inositolpentaphosphate qui ne possède qu'un hydroxyle libre, que pour l'inositoltétraphosphate qui en a deux et pour l'inositoltriphosphate trois, laisse supposer que les deux derniers corps n'ont pas d'hydroxyles libres vicinaux.



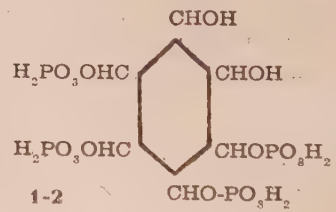
1-2-3



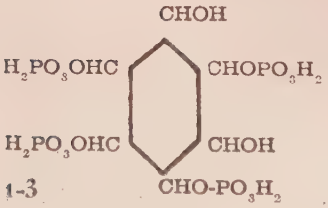
1-3-4



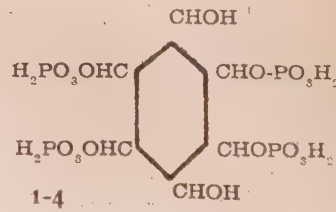
1-3-5



1-2



1-3



1-4

Il est cependant possible d'envisager que par empêchement stérique, les liaisons ester phosphorique entravent l'oxydation des groupements glycol voisins. Le voisinage d'une liaison ester phosphorique ne paraît cependant pas entraver l'oxydation des fonctions voisines. O. BAILLY [11] a proposé de caractériser les glycérophosphates, en oxydant par le brome la fonction alcool secondaire du glycol estérifié. Le dioxyacétonephosphate formé donne des produits colorés par condensation avec divers phénols en milieu sulfurique concentré et à chaud.

W. KIESSLING [62] a oxydé par le brome en milieu maintenu faiblement alcalin par la soude, les glycérophosphates. Le β glycérophosphate fournit avec un bon rendement l'acide phospho-2-glycérique tandis que l'α glycérophosphate conduit à un mélange des acides phospho-3-glycérique et phosphoglycolique.

P. FLEURY et J. COURTOIS ont montré [48] que le brome en milieu bicarbonaté oxyde quantitativement, en une heure, l'acide diosephosphorique $PO_3 H_2 - O - CH_2 - CHO$ en acide phosphoglycolique $PO_3H_2 - O - CH_2 - CO_2 H$.

L'acide phosphoglycolique formé fut isolé à l'état de sel de baryum et identifié.

J. COURTOIS [25] a oxydé par le brome en présence de carbonate de baryum l'acide glucose -2- phosphorique en acide phospho-2-gluconique.

En tout cas, si l'empêchement stérique peut entraver l'oxydation de deux fonctions alcooliques contiguës (formules 1-3-4 et 1-2), il paraît plus difficile de concevoir qu'il entrave celle de trois fonctions alcooliques contiguës dans le triphosphate 1-2-3.

L'action du brome permet donc d'envisager que les structures 1-3-4 et 1-2 ne sont pas probables et que la structure 1-2-3 doit être presque certainement rejetée.

B. — ACTION DE LA SOLUTION NITRIQUE DE BICHROMATE DE POTASSIUM

J. COURTOIS et R. BARRÉ [30] ont étudié l'action de ce réactif sur un certain nombre d'esters phosphoriques. Les esters possédant des fonctions alcooliques, cétoniques ou aldéhydiques libres sont oxydés assez rapidement et en général d'une façon complète. Les esters de fonctions alcooliques secondaires (β glycérophosphate-saccharosephosphate) sont oxydés avec libération de l'acide phosphorique estérifié.

Les esters d'une fonction alcool primaire comme l'α glycérophosphate sont oxydés avec formation d'acide phosphoglycolique très difficilement oxydable. Dans le tableau XIX nous avons groupé les principaux faits se dégageant des essais effectués.

TABLEAU N° XIX

ACTION DE LA SOLUTION NITROCHROMIQUE SUR DIVERS DÉRIVÉS DU CYCLOHEXANE

Corps étudié	Inositol hexa-phosphate	Inositol penta-phosphate	Inositol tétra-phosphate	Inositol tri-phosphate	Inositol	Cyclo-hexane-diol	Acide quinique	Dimédon
Atomes d'oxygène consommés par molécule de corps	infime	0 2	3 5	10 1	12 0	3 0	13 0	6 55
Allure de la réaction	oxydation pratiquement nulle	oxydation infime	oxydation assez lente et progressive avec mise en liberté d'acide phosphorique	réaction assez lente avec libération d'une grande partie de l'acide phosphorique estérifié	réaction complète et très rapide	oxydation très rapide en acide adipique	réaction très rapide et presque complète	réaction très rapide

Ces résultats sont assez différents de ceux obtenus avec le brome. L'oxydabilité des esters de l'inositol croît régulièrement de l'inositolhexaphosphate à l'inositoltriphosphate. L'inositoltriphosphate est oxydé presque totalement avec mise en liberté de 2,5 molécules d'acide phosphorique sur les trois estérifiées. La réaction évolue beaucoup plus lentement qu'avec les glycols dérivant du cyclohexane étudiés. L'oxydation de l'inositoltriphosphate paraît terminée après 4 jours de contact tandis qu'elle est complète au bout de 5 heures avec l'inositol, 8 heures avec le cyclohexanediol et 24 heures avec l'acide quinique. Ceci ne saurait surprendre, car il est nécessaire que les esters phosphoriques formés au début de l'oxydation soient hydrolysés pour que leurs fractions carbonées puissent être ensuite oxydées.

Il est à remarquer que pour l'inositoltriphosphate d'une part, 1/6e de l'acide phosphorique échappe à la minéralisation et reste estérifié après oxydation nitrochromique et que d'autre part, 1/6e du radical carboné ne soit pas transformé, puisque la quantité d'oxygène consommé est de 10 atomes contre 12 pour l'inositol.

En effet, l'oxydation paraît être stabilisée après 4 jours et ne pas progresser entre le quatrième et le huitième jour. Ce résultat pose le problème de l'homogénéité de l'inositoltriphosphate; est-il constitué par un seul corps ou par un mélange d'isomères ?

La seconde alternative serait dans ce cas la plus plausible. La concordance entre les proportions d'acide phosphorique estérifié et de carbone non combiné permettrait de penser que l'inositoltriphosphate étudié est constitué par un mélange de cinq parties d'un ou plusieurs isomères assez facilement oxydables et d'une partie d'un corps pratiquement non oxydé.

Dès lors, la forme à priori la plus résistante serait la forme 1-3-5 avec les trois fonctions alcool libres en méta ; les formes oxydées ayant la structure 1-2-3 ou 1-3-4. Cependant, une objection peut être formulée à cette interprétation ; l'oxydation nitro-chromique de l'acide α glycérophosphorique conduit à l'acide phosphoglycolique, il en est vraisemblablement de même pour l'acide glycolphosphorique Courtois et Barré [30].

Il n'est donc pas impossible que l'acide phosphorique qui demeure estérifié, après action du réactif nitro-chromique sur l'inositoltriphosphate, se trouve à l'état d'acide phosphoglycolique dont on peut envisager la formation à partir des trois structures proposées pour l'inositoltriphosphate.

L'inositoltétraphosphate peut posséder une fonction α glycol en 1-2 oxydable par analogie avec le cyclohexanediol en esterphosphorique d'un acide tétrahydroxyadipique

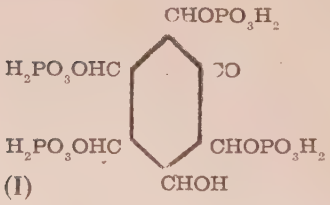
$$CO_2H — (CHO — PO_3H_2)^4 — CO_2H$$

Cette oxydation s'accompagnerait de la consommation de trois atomes d'oxygène. Nous pouvons remarquer qu'au début des réactions, les quantités d'oxygène consommées par le tétraphosphate et le cyclohexanediol (tableau VI, page 44 et n° XIII, page 56) sont sensiblement égales. L'allure de la réaction permettrait donc d'envisager que l'inositoltétraphosphate renferme une fonction α glycol et possède la structure 1-2.

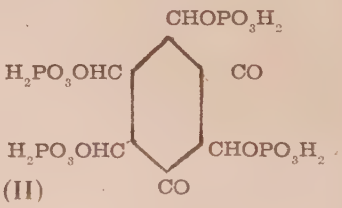
Ces résultats posent également le problème de l'homogénéité de l'inositoltétraphosphate. Après 1 jour de contact, l'action du réactif nitro-chromique paraît avoir abouti à son terme et il y a libération de 2,5 molécules d'acide phosphorique. Cependant, l'oxydation de la forme 1-2 en ester tétraphosphorique d'un acide tétrahydroxyadipique exigerait 3 atomes d'oxygène sur les 3,5 utilisés lorsque la réaction cesse de progresser ; par ailleurs, elle ne s'accompagnerait pas d'une libération d'acide phosphorique.

Le fait qui rend très délicate l'interprétation des résultats obtenus avec l'inositoltétraphosphate est le suivant : il y a discordance très marquée entre la quantité d'oxygène consommée et celle que l'on peut prévoir d'après la libération d'acide orthophosphorique. Tandis que 62 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié se trouve libéré, la quantité d'oxygène consommée par la fraction carbonée de l'ester, ne correspond qu'à 34 p. 100 de la consommation que l'on peut calculer à partir de l'inositol. Nous suggérons l'explication suivante, qui tend à admettre une libération supplémentaire d'acide phosphorique résultant des conditions de dosage de cet acide. Nous avons indiqué (p. 26) que l'acide phosphorique avait été dosé, après isolement sous forme de phosphomolybdate d'ammonium précipité par chauffage de 15 minutes à 100°. Dans ces conditions, les composés phosphorés acido-labiles seraient hydrolysés. En règle générale parmi les esters orthophosphoriques d'alcools, seuls sont acido-labiles, ceux possédant une fonction carbonylée libre. P. FLEURY. J. COURTOIS. A. DESJOBERT [52] [53].

Les esters d'acides alcools sont relativement acido-stables. Il devient donc possible d'envisager, que ce que nous dosons comme acide phosphorique minéral, est en réalité l'acide libéré d'un ester cétonique par exemple du type I et II résultant de l'oxydation nitrochromique de l'une ou de deux des fonctions alcool secondaire libres en fonction cétone.



(I)



(II)

L'oxydation nitrochromique des esters tri ou tétraphosphoriques fournit donc des résultats très difficiles à interpréter dans l'état actuel de nos connaissances. Elle ne peut conduire à des conclusions précises que sur un seul point. Nous avons signalé (p. 20) que S. et T. POSTERNAK ont montré que l'inositolpentaphosphate retiré des germes de Blé, était constitué d'une combinaison équimoléculaire d'un ester hexaphosphorique et d'un ester tétraphosphorique qu'ils purent séparer.

Il existe une différence considérable, entre l'oxydabilité de l'inositolpentaphosphate et celle de l'inositoltétraphosphate que nous avons

étudiées. En effet, l'inositolpentaphosphate consomme 0,2 atome d'oxygène. Si c'est la fraction tétraphosphorique du corps qui est oxydée, une molécule de cet inositoltétraphosphate consommerait 0,2 atome d'oxygène. L'inositoltétraphosphate étudié en a utilisé 3,5 atomes.

Nous pouvons ainsi en déduire, soit que l'inositolpentaphosphate retiré des germes de Blé et que nous avons étudié, est un véritable inositolpentaphosphate, soit qu'il résulte de l'association d'un inositolhexaphosphate à un inositoltétraphosphate différent de celui obtenu par hydrolyse phytasique partielle.

C'est donc sur ce point que le réactif nitrochromique fournit les indications les plus nettes.

C. — ACTION DE LA SOLUTION AQUEUSE DE PERIODATE DE SODIUM DANS L'ACIDE SULFURIQUE DILUÉ.

Le tableau XX réunit les principales données fournies par la littérature ou nos essais personnels.

Avant de passer à la discussion des principaux faits, un premier point doit être examiné préalablement, l'estérification phosphorique de fonctions alcooliques entrave-t-elle l'oxydation des groupements α glycol vicinaux ?

L'expérience de DANGSCHAT [34], qui n'a pas réussi à oxyder la fonction α glycol du tétracétylinositol, tendrait à indiquer que l'estérification de fonctions alcooliques de l'inositol entrave l'oxydation d'un groupement glycol voisin.

DANGSCHAT expose le résultat de ses expériences d'une façon extrêmement concise et opère avec une solution acétique d'acide périodique. Nous avons toujours utilisé ce réactif en solution aqueuse. Les données de DANGSCHAT sont trop peu précises, pour ne pas laisser planer un doute sur la résistance absolue du groupement α glycol libre. Comme nous l'avons signalé DANGSCHAT a pu rompre la liaison α glycol par le tétracétate de plomb, dont les propriétés oxydantes sont très proches de celles de l'acide periodique.

Dans deux revues récentes, J. COURTOIS [27] [29] a comparé les résultats obtenus par divers auteurs en soumettant divers esters phosphoriques à l'action de l'acide periodique. Le voisinage d'une liaison ester phosphorique ne paraît pas entraver l'oxydation des groupements voisins, ces groupements sont oxydés selon les règles fixées par MALAPRADE et P. FLEURY.

TABLEAU XX

Corps étudié	Inositol hexa-phosphate	Inositol penta-phosphate	Inositol tétra-phosphate	Inositol tri-phosphate	Inositol	Cyclitols voisins de l'inositol	Cyclo-hexane diol	Cyclo-hexane triol	Acide quinique	Dérivés des acides quinique et shikimique	Dimédon
Molécules d'acide periodique réduites par molécule de corps	0	0 05	0 8	1 6 à 1 7	4 0 en quelques minutes 6 7 en 4 jours	7 0 à 8 0 Molécules selon le corps	0 85	2 0	2 2	2 0	2 67
Allure de la réaction	nulle	négligeable	Réaction très lente progressant régulièrement jusqu'au 8e jour	Réaction lente progressant régulièrement jusqu'au 8e jour	Début extrêmement rapide, deuxième phase assez lente	Début très rapide pour le quercitol seul étudié, marche plus lente ensuite	réaction très rapide	Réaction assez rapide vitesse la plus élevée pour l'isomère cis	Réaction très rapide	Réaction très rapide	Réaction lente progressant régulièrement avec le temps

C'est ainsi que les esters du type :

$$PO_3H_2 — O — CH_2 — CHOH — CHOH — R$$

donnent naissance à l'acide diosephosphorique

$$PO_3H_2 — O — CH_2 — CH\ O$$

Lorsque la liaison ester est au voisinage d'une fonction cétonique dans les esters du type :

$$PO_3H_2 — O — CH_2 — CO — CHOH — R$$

l'acide phosphorique se retrouve estérifié, sous forme d'acide phosphoglycolique.

A notre connaissance, deux esters d'une fonction alcool secondaire ont été étudiés. Dans l'acide glucose — 2 — phosphorique, COURTOIS et RAMET [32], il se forme au cours d'un premier stade un ester phosphorique possédant 2 fonctions aldéhydiques :

$$CH_2OH — (CHOH)^3 — CH\ (OPO_3H_2) — CHO + 3O$$
$$= HCHO + 2HCO_2H + CHO — CH(OPO_3H_2) — CHO + OH_2$$

L'ester phosphorique est ensuite hydrolysé et oxydé selon le schéma :

$$CHO — CH(OPO_3H_2) — CHO + 4O = PO_4H_3 + 2CO_2 + HCO_2H$$

De son côté, l'acide phospho-2-gluconique est décomposé selon la réaction :

$$CH_2OH — (CHOH)^3 — CH(OPO_3H_2) — CO_2H + 3O$$
$$= HCHO + HCO_2H + CHO — CH(OPO_3H_2) — CO_2H + OH_2$$

L'ester phosphorique qui prend naissance est plus stable et n'est pas hydrolysé.

De ces données, il ressort que le voisinage d'une liaison ester phosphorique n'a pas entravé la rupture des fonctions libres voisines suivantes :

Alcool secondaire - alcool secondaire (glucose-2-phosphate, acide phospho-2-gluconique, glucose-1-phosphate, fructose-6-phosphate, ribose-5-phosphate) ; alcool secondaire - alcool primaire (α glycérophosphate) - alcool secondaire - cétone (fructose-1-6-diphosphate).

Un second point est cependant à envisager : le voisinage d'une liaison ester peut-il, sans modifier le terme de la réaction d'oxydation periodique, en retarder considérablement la vitesse ? Il semble que s'il y a ralentissement, il est de peu d'importance.

En effet, la réaction est totale après quelques minutes avec l'acide α glycérophosphorique P. FLEURY et PARIS [56]. Elle débute très

rapidement avec les esters de sucres, sensiblement la même vitesse que pour les mêmes sucres libres : fructose-6-phosphate COURTOIS et RAMET [32], fructose-1-6 diphosphate COURTOIS [24], glucose-2-phosphate COURTOIS et RAMET [32 bis], acide phospho-2-gluconique COURTOIS et RAMET [32 ter].

Nous pouvons donc en conclure que, dans tous les essais réalisés jusqu'ici, l'estérification par l'acide phosphorique n'a pas influé d'une façon appréciable, sur l'oxydation des groupements oxydables voisins.

Si l'on est tenté de généraliser ces résultats le tableau XIX et les tableaux qui ont servi à le composer (VI, p. 44 ; VIII p. 48 ; X, p. 54 ; XIII, p. 56 ; XVI, p. 58), montrent d'une façon indiscutable, que l'oxydation periodique des esters tri et tétraphosphoriques de l'inositol est infiniment plus lente que celle de fonctions α glycol libres. Avant de formuler une conclusion aussi ferme, il nous paraît cependant indispensable d'examiner d'une façon plus serrée, l'ensemble des résultats.

I. — INOSITOLPENTAPHOSPHATE. — Tout d'abord il existe une très nette différence entre le comportement des acides inositolpentaphosphorique et inositoltétraphosphorique (p. 41 et p. 44). Le premier ne réduit que d'une façon négligeable l'acide periodique alors que le second est attaqué lentement et progressivement. Nous pouvons donc proposer la même interprétation, que lors des essais avec le réactif nitro-chromique (p. 42). L'inositolpentaphosphate est un véritable inositolpentaphosphate ou une association à l'inositolhexaphosphate d'un inositoltétraphosphate différent de celui étudié séparément.

La fraction tétraphosphorique du pseudo-pentaphosphate se montrerait très résistante et presque certainement sans fonction α glycol libre.

II. — INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE. — Deux échantillons d'inositol tétraphosphate obtenus au cours de préparations distinctes, se comportent d'une façon sensiblement identique vis-à-vis de l'acide periodique. Si l'inositoltétraphosphate étudié est un mélange de deux où plusieurs isomères, ces isomères se retrouvent en proportions égales dans les deux échantillons. Il paraît difficile d'envisager que l'inositoltétraphosphate possède une fonction α glycol (structure 1-2, p. 62). Dans tous les dérivés non phosphorés du cyclohexane étudiés, la fonction α glycol est rompue en quelques minutes, avec consommation de une molécule d'acide periodique et formation de 2 fonctions aldéhydiques ; avec l'inositoltétraphosphate (tableau V· p. 43), 0,12

molécule d'acide periodique est réduite en 24 heures et moins de une molécule en 8 jours.

Par ailleurs, la proportion de substances réductrices formées, croit à peine après le deuxième jour : 0,25 molécule au lieu de 2,0.

S'il s'agissait d'une fonction α glycol très lentement rompue, la proportion de substances réductrices augmenterait parallèlement à la consommation d'acide periodique ; bien au contraire, c'est la proportion d'acide phosphorique soit libéré, soit demeurant sous forme labile qui augmente. Tout se passe donc comme si nous étions en présence d'une de ces oxydations très lentes par l'acide periodique, comme on en observe fréquemment, avec des composés assez divers : le dimédon (tableau XVII, p. 59) en fournit un exemple.

Comment envisager cette oxydation ? L'hypothèse la plus plausible est la transformation de une ou deux des fonctions alcool secondaire en fonction cétone (structure I et II, p. 66). De ce fait, une partie de l'inososephosphate serait hydrolysée en présence d'acide periodique et ses produits d'hydrolyse oxydés par la suite ; ceci expliquerait pourquoi le pouvoir réducteur se stabilise, la formation du corps correspondant à sa destruction.

D'autre part la formation d'un inososephosphate permettrait d'interpréter la formation d'esters acido ou alcalino-labiles.

Il n'est pas exclu qu'une partie, voire la totalité, de l'acide phosphorique minéral dosé, provient en réalité de la destruction d'un ester particulièrement alcalino-labile ; cet ester serait déphosphorylé en milieu ammoniacal, lors de la précipitation du phosphate ammoniaco-magnésien. Les triosephosphates qui sont extrêmement alcalino-labiles sont en effet déphosphorylés dans de telles conditions.

En résumé, l'oxydation de l'inositoltétraphosphate continue de progresser même après 8 jours. Il ne paraît pas possible de pouvoir la rapprocher de l'oxydation très rapide d'un groupement α glycol. Tout se passe, comme si nous assistions à la lente oxydation d'un corps de la structure 1-3 au 1-4 (p. 62).

III. — INOSITOLTRIPHOSPHATE. — Nous pouvons faire des observations semblables à celles formulées pour l'inositoltétraphosphate. Nous observons tout d'abord, que les deux échantillons obtenus au cours de préparations distinctes, se comportent d'une façon identique.

Rien ne permet de supposer que trois hydroxyles sont contigus (structure 1-2-3). Tous les dérivés à trois hydroxyles contigus sont oxydés très rapidement. Dans la structure 1-2-3, s'il y a empêchement stérique par le voisinage des fonctions ester, il est notablement

réduit pour le CHOH intercalé entre les deux autres fonctions alcooliques libres.

La formule 1-2-3 exigerait la réduction de 2 molécules d'acide periodique, avec formation de 2 aldéhydes; il n'y a que 1,75 molécule d'acide periodique consommée après 8 jours et 0,55 molécule d'aldéhyde formé. Un ensemble de faits plaident en faveur de la non existence de liaisons CHOH — CHOH :

a) Lenteur de la réaction, qui ne paraît pas terminée après 8 jours.

b) Faible quantité de substances réductrices formées, ne croissant plus, après 2 jours.

c) Parallèlisme entre l'oxydation periodique d'une part et l'apparition d'acide phosphorique minéral ou acido et alcalino-labile d'autre part.

Après 8 jours, presque tout l'acide phosphorique est libre ou sous forme labile. Il est très vraisemblable, qu'une partie de l'acide phosphorique a été libérée à partir d'un ester alcalino-labile au cours de la précipitation du phosphate ammoniaco-magnésien. En effet, le dosage de l'acide orthophosphorique libéré, indique que deux des liaisons ester sur les trois seraient rompues ; dans ce cas la fraction carbonée libérée consommerait une plus forte proportion d'acide periodique que celle observée (1.57 à 1.76 molécules pour l'inositoltriphosphate contre 6,7 molécules pour l'inositol.

Les arguments exposés au précédent paragraphe pour l'inositoltétraphosphate, permettent donc d'envisager que l'inositoltriphosphate est oxydé en dérivé cétonique d'une façon différente du schéma, MALAPRADE-FLEURY et ne possède donc pas de groupement α glycol. Il semble donc assez logique de lui attribuer la structure 1-3-5 avec les fonctions alcooliques libres en méta.

A) INOSITOLTRIPHOSPHATE

Ainsi l'inositoltriphosphate paraît bien posséder la formule symétrique 1-3-5 avec les fonctions alcooliques libres ou estérifiées disposées en *méta* les unes par rapport aux autres. Toutefois, une objection se présente, comme l'a obligeamment signalé T. POSTERNAK, dans une lettre personnelle à M. J. COURTOIS : « étant donné la configuration du méso-inositol (qui possède un plan de symétrie) l'inositoltriphosphate ne pourrait avoir que l'une des deux formules :

$P = OPO_3H_2$

Ces deux formules sont symétriques, ce qui est incompatible avec l'activité optique de l'inositoltriphosphate. »

Il nous paraît possible de concilier l'observation pertinente de T. POSTERNAK avec nos résultats. Le pouvoir rotatoire de l'inositoltriphosphate est minime, il peut provenir de la présence d'une petite quantité d'isomère 1-2-3 ou 1-3-4 avec une proportion considérable d'isomère 1-3-5.

D'ailleurs au cours de la discussion des résultats, nous avons plusieurs fois envisagé la possibilité d'un mélange d'isomères en proportions très différentes. Nous nous bornerons à conclure que *tout se passe comme si l'inositoltriphosphate analysé était constitué pour la plus grande partie de la forme méta* 1-3-5.

Lorsque nos essais furent terminés, nous eûmes connaissance d'un bref résumé d'un travail de FOLCH J. [58]. Ce dernier a séparé des phospholipides du cerveau, un diphosphoinositide contenant de l'acide inositolmétadiphosphorique. Les deux liaisons ester sont donc en position méta comme nous l'envisageons pour l'inositoltriphosphate.

B. — INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE

Nos résultats ne permettent pas de choisir entre les structures méta et para pour les hydroxyles libres. L'inositoltriphosphate est obtenu par une hydrolyse phytasique plus poussée que celle ayant permis de séparer l'inositoltétraphosphate, il paraît donc assez logique d'admettre que l'inositoltétraphosphate est déphosphorylé en triphosphate. De ce fait *la structure* 1-3 *avec les fonctions alcooliques libres en méta paraît être la plus probable.*

C. — INOSITOLPENTAPHOSPHATE

S'agit-il d'un véritable inositolpentaphosphate ou de l'association à l'inositolhexaphosphate d'un inositoltétraphosphate différent de celui analysé ?

Nous penchons pour la première alternative, l'inositoltétraphosphate associé ne paraît être que la forme 1-4 difficilement oxydable, mais dont l'oxydabilité ne devrait pas être très différente du dérivé 1-3-4. Cependant, l'inositolpentaphosphate est beaucoup plus difficilement oxydable que l'inositoltétraphosphate.

Par ailleurs, l'inositolpentaphosphate retiré des germes de blé ne dévie pas la lumière polarisée tandis que l'inositoltétraphosphate dévie la lumière polarisée (1).

---

(1) Il convient de remarquer que, comme nous l'avons signalé plus haut, le pouvoir rotatoire minime de l'inositoltétraphosphate ou de l'inositoltriphosphate peut être attribué à une faible proportion d'un isomère actif.

COMPARAISON DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES TROIS RÉACTIFS OXYDANTS ET CONCLUSIONS

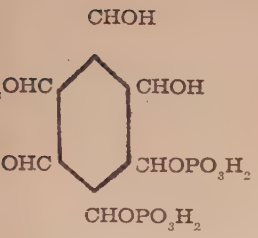
Dans le tableau XXI, nous avons rassemblé les conclusions pouvant être tirées de l'action de chaque réactif oxydant envisagé séparément.

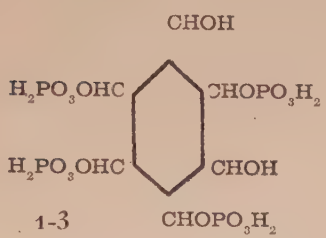
TABLEAU XXI

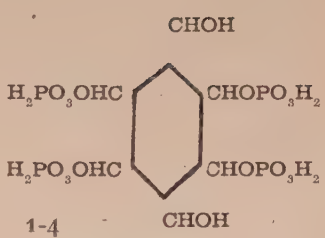
ESTER PENTAPHOSPHORIQUE

Formule proposée	Tableaux pages :	Véritable inositolpentaphosphate	Mélange équimoléculaire d'inositolhexaphosphate identique à celui obtenu par hydrolyse phytasique partielle	Mélange équimoléculaire d'inositolhexaphosphate et d'un inositoltetraphosphate différent de celui étudié
Brome en milieu bicarbonaté	XVIII p. 61	possible	possible	possible
Solution nitro chromique	XIX p. 64	possible	très douteux	possible
Acide periodique	XX p. 68	possible	très douteux	possible

ESTER TÉTRAPHOSPHORIQUE

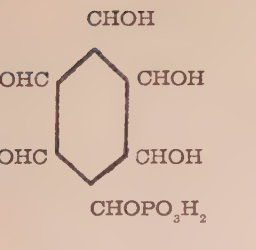


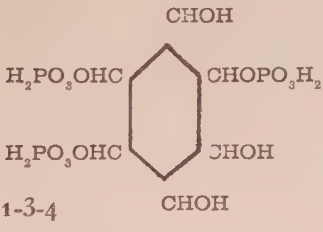


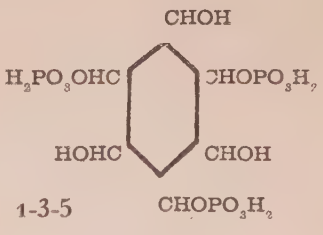


		1-2	1-3	1-4
Brome en milieu bicarbonaté	XVIII p. 61	très douteux	possible	possible
Solution nitro-chromique	XIX p. 64	possible	possible	possible
Acide periodique	XX p. 68	très douteux	possible	possible

ESTER TRIPHOSPHORIQUE







		1-2-3	1-3-4	1-3-5
Brome en milieu bicarbonaté	XVIII p. 61	extrêmement douteux	très douteux	possible
Solution nitro-chromique	XIX p. 64	possible	possible	possible
Acide periodique	XX p. 68	peu vraisemblable	très douteux	possible

De plus, comme nous le verrons page 95, l'inositolpentaphosphate est beaucoup plus difficilement hydrolysé par les enzymes, qu'un mélange équimoléculaire d'inositoltétraphosphate et d'inositolhexaphosphate.

Nous avons également tenté de résoudre notre inositolpentaphosphate en inositoltétraphosphate et inositolhexaphosphate à l'aide de la technique utilisée avec succès par S. et T. POSTERNAK [67]. Nos essais, répétés deux fois, ont échoué.

Il existe donc un ensemble de probabilités pour que l'inositolpentaphosphate que nous avons étudié, soit un véritable ester pentaphosphorique.

Ces essais ne nous permettent donc pas de préciser, avec une certitude absolue, la structure des corps étudiés.

Ils nous donnent cependant la possibilité de proposer les structures les plus probables ; si nous n'avons pas atteint pleinement notre but, nous pouvons cependant espérer que nos résultats faciliteront la tâche ultérieure d'autres chercheurs.

CHAPITRE VI

Influence du pH sur l'hydrolyse de deux inositolphosphates.

Les esters phosphoriques sont des coprs très résistants à l'action des agents chimiques d'hydrolyse. M^lle M. C. Bailly [9] [10] a montré que la stabilité de la liaison ester phosphorique est fonction du pH et que la vitesse d'hydrolyse était maximum aux environs de pH 4,1. P. Fleury [44] a signalé également que la vitesse d'hydrolyse de l'acide inositolhexaphosphorique est fonction du pH, la courbe représentant les variations de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la réaction du milieu, passe par un maximum vers pH 3,0. Cet auteur a remarqué que, dans les conditions où il opère, l'hydrolyse à pH 3,0 commence très rapidement et atteint 90 p. 100 à la cinquième heure, mais il faut chauffer pendant un temps allant jusqu'à vingt heures pour obtenir une hydrolyse totale; tout se passe comme si les esters dégradés qui prennent naissance, devenaient de plus en plus résistants à l'action hydrolysante de l'acide sulfurique.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier le comportement des inositoltétra et triphosphates, en les soumettant à l'action de l'acide sulfurique ou de la soude pendant une durée fixe et à une température supérieure à 100°.

CONDITIONS OPÉRATOIRES

L'inositoltriphosphate (page 36) et l'inositoltétraphosphate (page 34) isolés à l'état de sels de baryum sont débarrassés quantitativement de cet élément par de l'acide sulfurique N. Après élimination du sulfate de baryum nous procédons au dosage du phosphore total et du phosphore minéral puis ajustons à un volume convenable. Celui-ci est choisi de façon que notre solution possède une concentration M/10 en acide phosphorique estérifié. 6 cm^3 de solution d'ester M/10 en acide phosphorique estérifié sont amenés au pH

désiré, par addition soit d'acide sulfurique normal, soit de soude normale ; nous complétons alors à un volume de 12 cm³ avec de l'eau distillée.

La solution ainsi préparée est répartie dans des ampoules scellées, que nous disposons dans une étuve soigneusement réglée à 120° pendant une durée de 3 heures exactement. Après ce temps, les ampoules sont refroidies et il est possible de doser l'acide orthophosphorique libéré par la technique de COPAUX sur une prise d'essai exactement mesurée.

Nous signalerons d'autre part que tous nos essais sont réalisés sans addition de solutions tampons. Nous avons pu, en effet vérifier, que nous obtenions des résultats identiques en présence de solutions tampons.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau XXII pour l'inositoltétraphosphate et le tableau XXIII pour l'inositoltriphosphate. Ces différentes valeurs nous ont permis de construire les courbes (fig. I) d'hydrolyse de ces deux esters, en portant en ordonnées les milligrammes de phosphore libérés et en abcisses les différents PH, ou normalités acides.

TABLEAU XXII

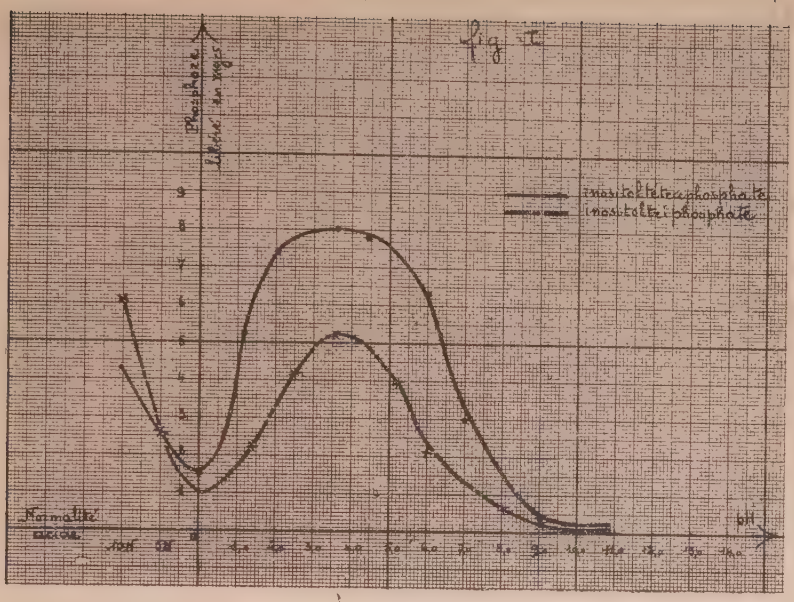
HYDROLYSE DE L'INOSITOLTÉTRAPHOSPHATE EN FONCTION DU pH PENDANT 3 HEURES A 120°

pH			0	1 2	2 0	3 6	4 4	6 0	7 0	9 0	14
Concentration en Normalité	10 N	5 N	N								
Phosphore libéré (mgr)	4 25	2 61	1 52	5 23	7 41	8 06	7 84	6 32	3 05	0 43	0
L'hydrolyse totale de l'ester libérerait 15,5 milligrammes de phospore sous forme de PO_4H_3.											

TABLEAU XXIII

HYDROLYSE DE L'INOSITOLTRIPHOSPHATE EN FONCTION DU pH PENDANT 3 HEURES A 120°

pH			1 4	2 5	3 6	5 2	6 0	8 0	9 0	11
Concentration en Normalité	10 N	5 N								
Phosphore libéré (en mgr)	6 10	2 61	2 18	4 14	5 23	3 92	2 18	0 65	0 21	0
L'hydrolyse totale de l'ester libérerait 15,5 milligr. de phosphore sous forme de PO_4H_3.										

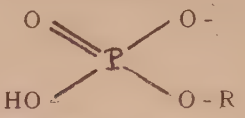


Les résultats obtenus avec les deux esters sont similaires. L'hydrolyse pratiquement nulle au-dessus de pH 9,0 augmente assez rapidement lorsque le pH diminue, passe par un maximum assez accentué vers pH 3,0-4,0, puis diminue assez brutalement lorsque l'acidité continue de croître. En dessous de pH 1,0, nous obtenons un minimum très accentué ; dès lors, pour une plus forte acidité, la vitesse de réaction croît très brutalement avec la concentration en acide sulfurique.

Dans ce laboratoire A. DESJOBERT [35] [36] a étudié d'une façon systématique l'hydrolyse en fonction de la réaction du milieu de divers esters phosphoriques. Les courbes tracées avec les esters mono-orthophosphoriques de l'éthanol et du glycol présentent la même allure que celles que nous avons tracées avec les esters tri ou tétraphosphoriques de l'inositol, l'optimum est situé cependant dans une zone un peu moins acide vers pH 4,5.

C'est pourquoi nous proposons d'interpréter les faits de la même façon que A. DESJOBERT (loc. cité). En milieu faiblement acide, la

vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration des ions



dans le milieu. La vitesse maxima observée correspond de ce fait au pH où la première fonction acide de l'acide phosphorique estérifié se trouve neutralisée. En dessous de pH 1,0 l'action catalytique propre à l'ion $[H]^+$ se manifeste et la vitesse d'hydrolyse croît avec la concentration en acide.

Nous pouvons également remarquer que quel que soit le pH, l'inositoltétraphosphate est hydrolysé plus rapidement que l'inositoltriphosphate.

Tout se passe donc comme si le voisinage des liaisons ester phosphorique favorisait leur hydrolyse acide.

Nous pouvons ainsi confirmer et préciser les observations de P. FLEURY sur le ralentissement de la vitesse de réaction au cours de l'hydrolyse progressive de l'inositolhexaphosphate.

CONCLUSIONS

Nous avons comparé les vitesses d'hydrolyse à différents pH des esters tri et tétraphosphoriques de l'inositol. Le tétraphosphate est toujours hydrolysé plus rapidement que le triphosphate. Les courbes représentant la vitesse de réaction en fonction du pH sont analogues à celles obtenues par P. FLEURY avec l'inositolhexaphosphate ou par A. DESJOBERT avec les esters de l'éthanol et du glycol. Il nous paraît possible d'étendre l'interprétation de ces faits, proposée par A. DESJOBERT (loc. cité) aux esters de l'inositol.

TROISIÈME PARTIE

ACTION DE DIVERSES PRÉPARATIONS PHOSPHATASIQUES SUR QUELQUES INOSITOLPHOSPHATES

INTRODUCTION

C'est en utilisant comme substrat un inositolhexaphosphate (la phytine) que SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAHASHI [77] décelèrent pour la première fois une activité phosphatasique. Il est assez paradoxal de constater que l'acide phytique est le composé phosphoré naturel le plus difficilement dédoublé par les phosphatases.

L'enzyme susceptible d'hydrolyser les inositolhexaphosphates fut dénommée *Phytase* ; comparativement aux autres phosphatases, la phytase n'a été que très rarement l'objet de recherches systématiques. Th. POSTERNAK [70].

De ces recherches assez disparates un premier fait se dégage avec netteté. Les phosphomonoestérases susceptibles d'hydrolyser des monoesters comme les glycérophosphates sont extrêmement répandues, par contre la phytase ne se rencontre qu'exceptionnellement chez les animaux et assez rarement chez les végétaux.

Les phytases relativement actives sont peu nombreuses (mycélium d'*Aspergillus*) — son de Blé — graines de Moutarde blanche, de Radis). La plupart des autres préparations ne manifestent une activité appréciable qu'après un contact prolongé (FLEURY et COURTOIS [47]. COURTOIS et PEREZ (recherches inédites).

Il en résulte donc que la plupart des préparations diastasiques relativement actives sur le β glycérophosphate, ne possèdent qu'une action nulle ou très minime sur l'inositolhexaphosphate.

Par contre, toutes les préparations décrites jusqu'ici et qui sont susceptibles de dédoubler l'inositolhexaphosphate, hydrolysent éga-

lement d'une façon rapide le β glycérophosphate Il apparaît donc possible d'envisager l'existence de deux catégories distinctes de phosphatases :

1) *Les phosphomonoestérases* banales susceptibles de dédoubler une grande variété de monoesters orthophosphoriques (ROCHE et COURTOIS [76], mais ne possédant qu'une action pratiquement nulle sur l'acide inositolhexaphosphorique (1).

2) *Les phytophosphatases* actives non seulement sur l'inositolphosphate, mais aussi sur d'autres monoesters comme les glycérophosphates. P. FLEURY et J. COURTOIS [49] appliquant au son de Blé les principales techniques de différenciation et séparation des enzymes n'ont jamais pu obtenir de préparations actives sur l'inositolhexaphosphate et inactives sur le β glycérophosphate.

Des recherches analogues réalisées avec les graines de Moutarde blanche (COURTOIS [28] et de Radis (COURTOIS et PEREZ [35]) ont fourni des résultats semblables confirmant l'existence d'une phytophosphatase distincte des monoestérases. Les spécificités respectives ne sont pas connues, il apparaît cependant que des monoestérases inactives sur l'inositolhexaphosphate peuvent dédoubler des esters de l'inositol moins riches en phosphore.

J. COURTOIS [26] a présenté différents faits justifiant cette conception. L'inositolhexaphosphate de sodium a été partiellement hydrolysé par l'acide sulfurique à pH 3,0 et à 100°. Lorsque environ 30 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié a été libéré, les esters résiduels sont partiellement hydrolysés par les phosphatases de graines ou feuilles d'Amandier et la taka diastase. Ainsi ces trois préparations inactives ou très peu actives sur l'inositolhexaphosphate dédoublent d'une façon notable ses produits d'hydrolyse partielle.

Le phénomène est beaucoup plus accentué si l'on réalise une hydrolyse partielle plus poussée du phytinate. Lorsque 50 p. 100 du phosphore organique a été minéralisé, les esters phosphoriques résiduels sont susceptibles d'être totalement hydrolysés par la phosphatase des graines d'Amandier et la taka-diastase. Par contre, ils ne sont que partiellement dédoublés par la phosphatase de feuilles d'Amandier et ne sont pas transformés par la phosphatase des os.

(1) Des essais inédits de COURTOIS, PLUMEL, PEREZ ont permis de montrer que des préparations très actives vis-à-vis des glycérophosphates finissent à la longue par provoquer une hydrolyse minime (1 à 5 p. 100) mais qui n'est pas absolument nulle de l'inositolhexaphosphate.

Dans les mêmes conditions les glycérophosphates sont hydrolysés à des vitesses de 100 à 1.000 fois supérieures.

J. Courtois [26] a confirmé ces données en montrant que la monoestérase des graines d'Amandier, inactive sur l'inositolhexaphosphate, accélère l'hydrolyse de ce substrat par le son de Blé; cette accélération est surtout manifeste lorsque le substrat est partiellement dédoublé, tout se passe comme si les monoestérases hydrolysaient certains inositolphosphates moins riches en phosphore que l'inositolhexaphosphate, ces corps prendraient naissance au cours de l'action de la phytophosphatase du son de Blé sur l'acide phytique.

Nous nous sommes donc proposés de préciser la spécificité de diverses préparations phosphatasiques sur les inositolphosphates que nous avions isolés.

PROTOCOLE DES ESSAIS

1° *SUBSTRATS*

Les esters phosphoriques ont été employés sous forme de sels sodiques ou amenés à cet état.

Nous avons utilisé le β glycérophosphate de sodium cristallisé et purifié. L'inositolhexaphosphate de sodium que nous avons préparé (page) l'inositolpentaphosphate isolé des germes de Blé (page) les inositotétra tri et monophosphates obtenus par hydrolyse partielle de l'inositolhexaphosphate de sodium par la phytase du son de Blé (1).

Tous ces esters ont été isolés à l'état de sel de baryum. Le baryum a été éliminé par un léger excès d'acide sulfurique normal. Pour cela chaque prise d'essai est soigneusement triturée avec la solution acide dans un mortier en verre, puis soumise à l'agitation mécanique pendant deux heures; après un repos de vingt-quatre heures, nous filtrons et neutralisons le filtrat à l'aide de soude normale en présence d'un peu de phénolphtaléine. Nous procédons alors au dosage du phosphore total et du phosphore minéral, puis ajustons à un volume convenable. Ce dernier a été choisi de façon que toutes les solutions possèdent une concentration M/10 en acide phosphorique estérifié.

2° *PRÉPARATIONS DIASTASIQUES*

Nous avons utilisé différentes préparations appartenant aux règnes végétal et animal. Nous les groupons en suivant la classification habituelle observée pour les phosphomonoestérases, ROCHE et COURTOIS [76].

A) PHOSPHOMONOESTÉRASES DU TYPE I

Elles se rencontrent dans les tissus des mammifères et ont un pH maximum d'action situé en milieu faiblement alcalin, en général aux

(1) En raison de la faible quantité obtenue d'inositol monophosphate, nous n'avons étudié son comportement qu'avec quelques enzymes caractéristiques.

alentours de pH 8,4. Nous avons choisi comme source de phosphatase I : le rein, le foie et l'intestin de Chien ; les os de Cobaye et le plasma humain.

a) *Phosphatases rénale et hépatique.* — Les organes prélevés sur le chien aussitôt après la mort de l'animal sont débarrassés de leurs membranes et tissus adipeux. Ils sont pulpés énergiquement par petites portions, à l'aide de ciseaux dans le fond d'un verre à pied. La pâte obtenue est ensuite broyée avec du sable de Fontainebleau préalablement lavé et calciné, puis mise à macérer pendant 8 jours à la glacière dans cinq parties d'eau distillée saturée de chloroforme.

La préparation centrifugée est alors utilisée directement pour nos essais.

b) *Phosphatase osseuse.* — Les humérus et fémurs de Cobaye prélevés aussitôt après avoir sacrifié l'animal sont soigneusement nettoyés puis broyés dans un mortier. Le produit obtenu est délayé dans cinq parties d'eau saturée de chloroforme. Nous laissons en contact à la glacière pendant huit jours et filtrons.

c) *Phosphatase de l'intestin du chien.* — Nous avons suivi la technique préconisée par M^lle^ Besse de Laromignière [12].

L'intestin grêle, aussitôt après le prélèvement est nettoyé par passage d'un courant d'eau, puis ouvert sur toute sa longueur. La muqueuse est séparée par un râclage léger au scalpel, puis mise en suspension, dans environ deux fois son poids d'eau distillée additionnée d'un excès de choroforme (environ 4 p. 100). La macération conservée cinq jours à la glacière est utilisée après centrifugation.

d) *Phosphatase du plasma sanguin.* — Le sang est recueilli par ponction veineuse, sur citrate de sodium, chez un sujet à jeun. Nous le centrifugeons et l'utilisons immédiatement.

B) PHOSPHOMONOESTÉRASES DU TYPE II

A l'inverse des précédentes, elles sont peu répandues dans les tissus des Mammifères. On les rencontre cependant en proportions appréciables dans la prostate et l'urine.

Par contre les végétaux en constituent la source la plus importante.

Le son de Blé (*Triticum Sativum*-Graminées) est celui que nous avons utilisé pour la préparation des inositoltétra tri et monophosphates (chapitre II 1^re^ partie). Les graines de Brome des Prés (*Bromus pratensis*-Graminées) sont coupées et finement divisées. Les graines de Moutarde blanche (*Sinapis alba*, Crucifères) sont triturées

et finement broyées au mortier. Les graines de Soja (*Soja hispida*, Légumineuses) sont réduites par broyage en farine que nous tamisons. L'émulsine a été extraite des Amandes douces (*Amygdalis communis*, Rosacés) par la technique de H. HÉRISSEY [61].

Nous avons préparé une macération de ces graines pulvérisées dans cinquante parties d'eau toluénée pendant vingt-quatre heures à la glacière.

Les graines de Brome et Dactyle sont peu actives; nous avons dû employer des macérations à 10 p. 100. Nous avons en outre utilisé une suspension à 2 p. 100 d'émulsine. Toutes ces préparations ont été filtrées sur papier avant usage.

f) *Phosphatase de la prostate.* — Après ablation chirurgicale, la prostate humaine prélevée a été pulpée de la même façon que les reins et le foie du chien. Nous la laissons macérer à la glacière dans cinq fois son poids d'eau toluénée pendant huit jours. Nous filtrons sur papier avant emploi.

g) *Phosphatase urinaire.* — L'urine a été recueillie le matin au réveil et utilisée directement.

C) PHOSPHOMONOESTÉRASES DU TYPE III

Leur pH optimum d'action est situé aux environs de 4,0 elles sont très fragiles, et se rencontrent principalement dans les moisissures du genre *Aspergillus*.

La taka-diastase de l'*Aspergillus Orizae* en poudre de la firme Parke-Davies, fut utilisée pour nos essais.

Nous n'avons pas utilisé de monoestérase du type IV qui est de beaucoup la moins répandue.

3° *MESURE DE L'ACTIVITÉ*

Dans le but de faciliter la comparaison des résultats; nous nous sommes efforcés, dans la mesure du possible, de toujours suivre le même protocole opératoire.

Nous avons utilisé la technique employée par J. COURTOIS [23]. Nous déféquons, puis précipitons l'acide phosphorique libéré sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien. Ce dernier recueilli est dosé par la méthode de COPAUX.

Chaque substrat mis en solution sous forme d'acide libre est amené à une concentration M/10 en acide phosphorique estérifié, ajusté au pH de l'essai à l'aide soit d'acide acétique 2N, soit de soude N. Dans un flacon de 60 centimètres cubes préalablement stérilisé à 100°, nous mesurons successivement 5 centimètres cubes de solution de substrat, puis 10 centimètres cubes de préparation diastasique clari-

fiée par filtration sur papier ou mieux par centrifigation, enfin 5 centimètres cubes d'un tampon (1) ; nous complétons alors à 50 cm^3 à l'aide d'eau distillée et ajoutons quelques gouttes de toluène.

Pour chaque série d'essais, nous avons eu soin de préparer des essais témoins de composition analogue, mais en remplaçant les 5 centimètres cubes de substrat par 5 centimètres cubes d'eau distillée. Nous avons ainsi pu déterminer l'acide phosphorique préexistant dans la préparation diastasique ou libérable à partir des combinaisons phosphorées organiques de cette préparation diastasique.

Tous les flacons sont placés à l'étuve à 37° pendant 48 heures. Cependant les essais avec le Brome et le Dactyle ont été maintenus 3 jours à 37° par suite de leur faible activité phosphatasique.

Au sortir de l'étuve, le contenu des flacons est additionné de 20 centimètres cubes de mixture magnésienne (nitrate de magnésium 50 gr. nitrate d'ammonium 100 gr. eau qsp. 1.000 cm^3) et de 10 cm^3 d'un mélange à volumes égaux d'acide acétique cristallisable et d'acétate d'ammonium officinal. Nous maintenons alors le liquide 30 minutes sur un bain-marie à 100° dans le but d'inactiver la diastase et de floculer les protéines. Le précipité formé est éliminé par filtration. Le filtrat et les eaux de lavage sont franchement alcalinisés par de l'ammoniaque en présence de phtaléine du phénol. Le phosphate ammoniaco-magnésien cristallise, après 24 heures il est recueilli, lavé à l'eau ammoniacale, dissous dans l'acide nitrique dilué et dosé par la technique de COPAUX (2).

Pour le plasma sanguin nous avons suivi le même protocole opératoire que dans la technique de BODANSKY [14], utilisée pour déterminer la phosphatasémie [45], en raison des faibles quantités d'acide phosphorique libérées. Le substrat à la dose de 2 centimètres cubes est mis en présence de 2 cm^3 de plasma et de 2 centimètres cubes de tampon au véronal sodique. Nous laissons en contact 24 heures à

(1) Nous avons eu recours à l'un des trois tampons suivants :

pH 4,0	Acétate de Sodium : 36	cm^3
	Acide acétique N : 164	cm^3
pH 5,2	Acide acétique 2N : 100	cm^3
	Soude N. 150	cm^3
pH 8,0	Solution de Véronal sodique M/10	

(2) Le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien est toujours mélangé à un précipité amorphe de sels de magnésium des inositolphosphates ; ces esters n'entravent pas la détermination de l'acide orthophosphorique par la technique de Copaux, si nous avons soin d'utiliser un excès suffisant de réactif molybdique.

l'étuve à 37°. L'acide phosphorique libéré est complexé au molybdène, ce dernier devient réductible par l'hydroquinone. La coloration qui se développe est comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions à partir d'une solution titrée de phosphate acide de potassium.

RÉSULTATS

Nous avons donc opposé chacun de ces substrats aux différentes préparations diastasiques d'après le protocole indiqué. Les résultats sont indiqués dans le tableau récapitulatif n° XXIV (page 90), où nous avons groupé les différents enzymes d'après la classification habituellement utilisée pour les phosphomonoestérases.

Nous pouvons d'abord constater que toutes les préparations étudiées possèdent une très notable action hydrolysante sur le β glycérophosphate, par contre leur comportement présente de nettes divergences quand nous nous adressons aux inositolphosphates. Un seul enzyme : le son de Blé, hydrolyse plus rapidement l'inositolhexaphosphate que le β glycérophosphate.

Nous classerons nos préparations suivant qu'elles hydrolysent ou non l'inositolhexaphosphate.

Le premier groupe comprend les enzymes inactifs sur ce substrat. Ce sont les cinq phosphomonoestérases du type I étudiées : rein, foie, intestin de Chien, os de Cobaye, plasma humain. Toutes ces diastases hydrolysent fortement le β glycérophosphate puisque en 48 heures la totalité a été hydrolysée par le rein, 80 p. 100 avec l'os de Cobaye, 74,3 pour l'intestin de Chien, 56 p. 100 pour le foie. Le plasma humain n'a hydrolysé que 22,0 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié.

Dans les mêmes conditions d'action, ces diverses préparations diastasiques ont laissé intact les inositolhexa, penta et tétraphosphates. Leur action commence à s'ébaucher pour l'inositoltriphosphate, pour se manifester nettement avec l'inositolmonophosphate, puisque le foie de Chien arrive à libérer 28,5 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié de ce substrat et l'intestin 14,2 p. 100 pour ne citer que les cas les plus démonstratifs.

Le phosphatase II de l'urine, dont nous avons mesuré l'activité d'après la technique préconisée par Biget [13], a une action analogue à celle des phosphatases alcalines, mais cependant son action sur l'inositoltriphosphate est un peu plus accentuée, puisque nous arrivons à 14,3 p. 100 d'hydrolyse, soit environ le double du résultat obtenu par l'intestin de Chien qui paraît être la source la plus active du groupe précédent.

TABLEAU XXIV

ACTION DE QUELQUES ENZYMES SUR DIVERS INOSITOLPHOSPHATES

Origine de l'enzyme	pH où s'est effectué l'hydrolyse	β Glycérophosphate	Inositol hexaphosphate	Inositol pentaphosphate	Inositol téraphosphate	Inositol triphosphate	Inositol monophosphate
Rein (Chien)	8 4	100 0 (1)	0	0	0	4 3	
Foie (Chien)	8 4	45 7	0	0	0	0	28 5
Intestin (Chien)	8 4	74 3	0	0	0	7 1	14 2
Os (Cobaye)	8 4	80 0	0	0	0	Traces	5 7
Plasma (Homme)	8 4	22 8	0	0	0	Traces	3 5
Son de Blé	5 2	29 6	64 0	60 0	57 0	41 0	
Brome des prés	5 2	34 3	4 2	2 8	2 8	8 5	12 8
Dactyle	5 2	42 8	4 2	2 8	2 8	8 5	12 8
Moutarde	5 2	81 0	17 0	20 0	65 0	57 0	
Soja	5 2	29 6	3 5	Traces	30 0	21 0	
Emulsine d'Amande	5 2	78 0	3 5	Traces	31 0	31 0	
Prostate (Homme)	5 2	97 1	11 4	14 2	22 8	51 4	
Urine (Homme)	5 2	101 0	0	0	0	14 3	10 0
Taka-diastase	4 0	51 4	0	0	0	0	Traces

(1) Les chiffres représentent le pourcentage de l'acide phosphorique estérifié qui a été libéré Conditions opératoires page 87; hydrolyse de 48 heures à 37° à l'exception du plasma (24 heures) et des graines de Brome et Dactyle (72 heures)

La taka-diastase, phosphatase du type III, est douée d'une activité monoestérasique notable, mais demeure absolument sans action sur les inositolphosphates. Cependant un faible pouvoir hydrolysant se manifeste sur l'inositolmonophosphate.

Le deuxième groupe comprend tous les enzymes de graines et une seule préparation d'origine animale : la prostate humaine. Toutes ces préparations renferment des phosphomonoestérases.

Le comportement vis-à-vis des divers inositolphosphates varie selon l'origine de l'enzyme. Seul le son de Blé hydrolyse d'autant plus rapidement les inositolphosphates que leur teneur en phosphore est plus élevée. Nous observons en effet 41 p. 100 d'hydrolyse pour l'inositoltriphosphate contre 64 p. 100 pour l'inositolhexaphosphate ; les pourcentages d'hydrolyse de l'inositoltétraphosphate (57 p. 100) et de l'inositolpentaphosphate (60 p. 100) étant intermédiaires.

C'est à notre connaissance la phytase la plus active actuellement décrite, son comportement permet de supposer que la phytophosphatase dédouble plus rapidement les esters hexa et pentaphosphoriques que les autres esters moins riches en phosphore : inositoltétra-tri ou monophosphates et même β glycérophosphate. La phytophosphatase exercerait donc d'autant mieux son action qu'il y a plus de liaisons ester phosphorique rapprochées à transformer.

Tout en notant, la très nette action phosphatasique de ces diverses préparations, nous pouvons constater que l'activité phytasique la plus importante est celle de la graine de Moutarde. Elle libère 17 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié dans l'inositolhexaphosphate, cette proportion s'accentue avec l'inositolpentaphosphate et s'affirme très nettement pour l'inositoltétraphosphate où l'hydrolyse atteint 65 p. 100.

Nous observons alors que cette préparation, de même que la farine de Soja, hydrolysent l'inositoltétraphosphate plus rapidement que l'inositoltriphosphate.

La préparation de prostate et les autres enzymes de graines hydrolysent les esters penta et hexaphosphoriques à des vitesses minimes et sensiblement égales, deux préparations font exception : la prostate et la Moutarde, où nous notons 14,2 p. 100 et 20 p. 100 d'hydrolyse pour l'inositolpentaphosphate contre 11,4 p. 100 et 17,0 p. 100 avec l'inositolhexaphosphate.

A partir de l'inositoltétraphosphate, nous observons une brusque modification, se manifestant par un accroissement considérable de la vitesse d'hydrolyse. Cependant, le Brome des Prés et le Dactyle glomeré dédoublent les esters tri et tétraphosphoriques à une vitesse

à peine supérieure de celle observée sur les esters penta et hexaphosphoriques. Par contre l'inositoltétraphosphate est dédoublé plus rapidement que les esters penta et hexaphosphoriques par la Moutarde, le Soja, l'Amandier et la prostate.

Enfin, tandis que la prostate hydrolyse le triphosphate beaucoup plus rapidement que ce tétraphosphate, les enzymes des graines dédoublent ces substrats à des vitesses sensiblement équivalentes, égales pour l'émulsine : 31 p. 100, un peu supérieure pour le triphosphate : Brome des Prés et Dactyle, un peu supérieure pour l'inositoltétraphosphate : Blé, Moutarde, Soja.

Si nous examinons maintenant l'ensemble des résultats, nous constatons que les préparations du premier groupe sont dépourvues de phytophosphatase, les phosphomonoestérases qu'elles contiennent, inactives sur les esters tétra, penta et hexaphosphoriques, peuvent par contre dédoubler le monophosphate et plus difficilement le triphosphate.

Avec les enzymes du second groupe, il est assez difficile de séparer l'action de la phytophosphatase de celle de la phosphomonoestérase ; il convient cependant de remarquer que les préparations où l'activité sur le β glycérophosphate est relativement élevée par rapport à celle sur l'inositolhexaphosphate, hydrolysent en général l'inositoltriphosphate plus rapidement que le tétraphosphate ; ceci impliquerait une action simultanée de la phosphomonoestérase et de la phytophosphatase sur l'inositoltriphosphate. Il est toujours très difficile de préciser les spécificités respectives de deux enzymes associées, le cas étudié confirme cette règle.

Nous avons réalisé quelques essais de longue durée avec les mêmes proportions de substrats et d'enzymes, mais en prolongeant l'hydrolyse pendant 8 jours.

TABLEAU XXV

ACTION PROLONGÉE DE QUELQUES ENZYMES SUR LES INOSITOLTÉTRA ET TRIPHOSPHATES

Enzymes	Substrats	
	Inositoltétraphosphate	Inositoltriphosphate
Rein (Chien)	1 50 (1)	1 50
Moutarde blanche	100 00	100 00
Soja	55 70	61 4
Emulsine d'Amande	40 0	44 2

(1) Ces chiffres ont la même signification que dans le tableau XXIV, page 90 ; hydrolyse pendant 8 jours à 37°.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau N° XXV, page 92. nous remarquons que le rein de Chien n'a hydrolysé que très faiblement (1,50 p. 100) les inositoltri ou tétraphosphates. Par contre, la graine de Moutarde blanche a hydrolysé totalement ces mêmes substrats, et le Soja libère 55,7 p. 100 de l'acide phosphorique estérifié de l'inositoltétraphosphate et 61,4 p. 100 de l'inositoltriphosphate. L'Emulsine d'Amande beaucoup moins active a hydrolysé 40 p. 100 de l'acide phosphorique de l'inositoltétraphosphate et 44,2 p. 100 de l'inositoltriphosphate.

Nos résultats apportent des précisions nous autorisant à tenter d'interpréter les données expérimentales de WRENSHALL et DYER [79] dans un autre domaine. Ces auteurs isolèrent de la terre arable un inositolphosphate séparé sous forme de sel ferrique. Une préparation phosphatasique de muqueuse intestinale de Porc libère 5 p. 100 du phosphore du phytinate de sodium et dans les mêmes conditions 27 p. 100 à partir de l'ester isolé du sol. Le son de Blé a libéré 85 p. 100 du phosphore du phytinate de sodium et 89 p. 100 à partir de l'ester retiré du sol. Si nous nous basons sur le comportement des phosphatases alcalines animales, l'ester retiré du sol serait moins riche en phosphore qu'un inositoltétraphosphate, ce serait sans doute un inositoltriphosphate, comme l'ester retiré également de l'humus par BOWER C.A. [16].

HYDROLYSES COMPARÉES DE L'INOSITOLPENTAPHOSPHATE ET D'UN MÉLANGE ÉQUIMOLÉCULAIRE D'INOSITOLTÉTRA ET HEXAPHOSPHATES

S. et T. POSTERNAK [67] ont extrait des germes de Blé, un corps présentant la composition centésimale d'un inositolpentaphosphate ; ils purent montrer que ce corps était en réalité une association équimoléculaire d'esters tétra et hexa phosphoriques de l'inositol, ils réussirent à séparer ces deux corps.

Au cours de notre étude sur l'oxydation des inositolphosphates par divers réactifs (pages 41 et 44) nous avions observé que l'ester pentaphosphorique retiré des germes de Blé est très difficilement oxydé, tandis que l'ester tétraphosphorique est plus facilement oxydable. Il était permis d'envisager que le corps que nous avions isolé, pouvait être un véritable inositolpentaphosphate ou bien encore qu'il résultait de l'association à l'acide phytique, d'un acide inositoltétraphosphorique différent de celui isolé après hydrolyse phytasique partielle de l'inositolhexaphosphate. Nous avons déterminé l'action de préparations phosphatasiques d'une part sur un mélange équimoléculaire d'inositoltétra et hexaphosphates, d'autre part sur l'inositolpentaphosphate que nous avions isolé des germes de Blé.

TABLEAU XXVI

ACTION DES PRÉPARATIONS PHOSPHATASIQUES SUR L'INOSITOLPENTAPHOSPHATE ET SUR UN MÉLANGE ÉQUIMOLÉCULAIRE D'INOSITOLTÉTRA ET HEXAPHOSPHATES

Cm³ de substat M/10 en PO_4H_3 estérifié			Milligrammes de P. libérés par l'enzyme (sous forme de PO_4H_3)		
Inositol hexa-phosphate	Inositol penta-phosphate	Inositol tétra-phosphate	Emulsine d'Amande	Graine de Soja	Graine de Moutarde blanche
3	0	0	0 43	0 43	4 36
0	0	2	0 86	2 15	5 6
3	0	2	1 31	3 05	7 8
0	5	0	Traces	Traces	3 6

Essais réalisés à pH. 5, 2 dans les conditions opératoires habituelles (page 87), hydrolyse de 48 heures à 37°.

Les essais (tableau XXVI) ont été réalisés avec trois préparations d'origine végétale. Dans le mélange équimoléculaire d'inositoltétra et hexaphosphates (3 cm³ de la solution M/10 (en acide phosphorique estérifié) de l'inositolhexaphosphate et 2 cm³ de solution M/10 (en acide phosphorique estérifié) de l'inositoltétraphosphate) les quantités d'acide phosphorique minéral libérées sont sensiblement égales à la somme des quantités libérées à partir de chacun de ces deux substrats hydrolysés indépendamment (1).

Par contre, l'inositolpentaphosphate extrait des germes de blé est hydrolysé d'une façon infiniment moins accentuée par les trois préparations diastasiques, qu'une proportion équivalente du mélange de tétra et hexaphosphate. Ainsi le pentaphosphate que nous avons isolé se comporte différemment d'un mélange d'hexaphosphate et du tétraphosphate que nous avons étudié. Ceci aussi bien vis-à-vis des réactifs chimiques oxydants, que vis-à-vis des enzymes, réactifs d'une extrême spécificité.

CONCLUSIONS

Nous avons soumis divers inositolphosphates à l'action de préparations très actives sur le β glycérophosphate. Les phosphomonoestérases alcalines d'origine animale, les phosphatases acides de l'urine et de la taka-diastase hydrolysent l'acide inositolmonophosphorique et plus difficilement l'acide inositoltriphosphorique. Les esters tétra, penta ou hexaphosphoriques de l'inositol ne sont pas hydrolysés par ces phosphomonoestérases.

La prostate et les préparations de graines étudiées contiennent un mélange de phosphomonoestérase et de phytophosphatase et ont hydrolysé selon des modalités variables les divers esters de l'inositol. Il apparaît que la phytophosphatase des graines est susceptible d'hydrolyser les inositolpenta et hexaphosphates que ne peuvent hydrolyser les phosphomonoestérases associées des mêmes graines. Vis-à-vis de quelques préparations phosphatasiques, l'inositolpentaphosphate se comporte différemment d'un mélange équimoléculaire d'inositolhexaphosphate et de l'inositoltétraphosphate que nous avons utilisé.

(1) Dans le cas de la Moutarde blanche, l'hydrolyse est assez poussée (50 p. 100 environ) ; de ce fait l'action des phosphates libérés se manifeste plus nettement sur le mélange des deux substrats que sur l'hydrolyse de ces derniers transformés séparément.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous nous sommes efforcés de préciser les propriétés et la constitution d'esters phosphoriques de l'inositol moins riches en phosphore que l'acide inositolhexaphosphorique.

L'analyse des publications relatives à ces corps nous a montré en effet qu'ils étaient mal connus et que l'on ne possédait aucune donnée sur leur structure.

Nous avons utilisé pour nos essais l'inositolpentaphosphate retiré des germes de Blé, les esters tétra et triphosphoriques obtenus après hydrolyse incomplète plus ou moins poussée de l'inositolhexaphosphate par la phytase du son de Blé. Ces esters ont été obtenus en suivant le protocole opératoire décrit par S. et T. POSTERNAK, auquel nous avons apporté quelques améliorations de détail.

La composition des corps étudiés a été vérifiée en dosant l'acide orthophosphorique et l'inositol libéré par hydrolyse sulfurique totale.

I. — Nous avons étudié parallèlement l'action de trois réactifs oxydants sur ces esters et sur divers dérivés du cyclohexane possédant les fonctions alcool secondaire contiguës. Ces deux essais furent réalisés à la température du laboratoire.

1) Le brome en milieu bicarbonaté oxyde assez rapidement et d'une façon relativement complète les fonctions alcooliques contigües de l'inositol, du cyclohexanediol et de l'acide quinique.

Par contre, le brome n'est pratiquement pas réduit, même après contact prolongé, par les esters tri, tétra, penta et hexaphosphoriques de l'inositol.

2) La solution nitrique de bichromate de potassium oxyde rapidement et complètement les fonctions alcool de l'inositol, du cyclohexanediol et de l'acide quinique. Elle attaque assez fortement l'inositoltriphosphate, d'une façon nettement moins marquée l'inositoltétraphosphate ; par contre elle est pratiquement sans action sur les esters penta et hexaphosphoriques.

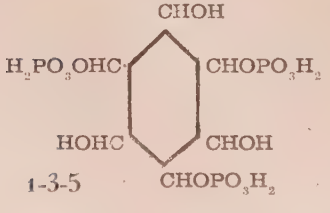
3) Les données de la littérature et nos expériences personnelles complémentaires montrent que la solution sulfurique de periodate de sodium oxyde rapidement les dérivés du cyclohexane possédant au moins une fonction α glycol. Or les esters penta et hexaphosphoriques de l'inositol ne sont pratiquement pas attaqués par l'acide periodique ; mais l'inositoltétraphosphate est oxydé très lentement et progressivement avec apparition d'une faible quantité de substances réductrices, qui n'est pas en proportion directe de la quantité d'acide periodique réduit.

Par contre, il existe un certain parallèlisme entre d'une part la quantité d'acide periodique réduite et d'autre part l'apparition d'acide orthophosphorique libre et d'esters phosphoriques acido et alcalinolabiles.

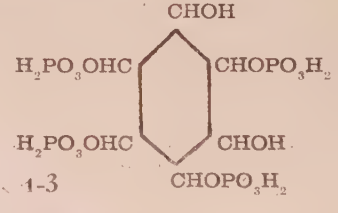
L'oxydation de l'inositoltriphosphate présente des caractéristiques similaires mais la quantité d'acide periodique réduite est la plus importante. Le fait le plus saillant qui se dégage de ces essais est la très grande différence qui existe entre la vitesse d'oxydation des glycols dérivés du cyclohexane et celle des esters tri et tétraphosphoriques de l'inositol.

Nous avons alors procédé à une comparaison détaillée des résultats obtenus avec les divers corps ; par ailleurs nous avons tenu compte des résultats obtenus par P. Fleury, J. Courtois et leurs élèves, en faisant réagir les mêmes réactifs oxydants sur des esters phosphoriques définis.

Nous ne ferons que résumer les conclusions qui nous paraissent les plus logiques à la suite de la discussion des résultats (chapitre V). Il semble des plus probables que les esters tri et tétraphosphoriques possèdent leurs fonctions alcooliques libres disposées en méta ; ces deux esters présenteraient donc les structures suivantes :



1-3-5



1-3

Il n'est cependant pas illogique d'envisager que les corps étudiés contiennent une faible proportion d'isomères de position, possédant leurs fonctions alcooliques libres disposées en para ; la position ortho paraissant fort peu vraisemblable.

II. — A 120° en milieu acide l'acide inositoltétraphosphorique est hydrolysé plus rapidement que l'acide inositoltriphosphorique. Pour les deux esters la vitesse de réaction en fonction du pH passe par un maximum assez accentué vers pH 3,0; 4,0.

III. — Nous avons soumis ces divers esters phosphoriques de l'inositol à l'action de préparation phosphatasiques; dans des conditions où le β glycérophosphate est toujours hydrolysé d'une façon très marquée et parfois même totalement.

Les enzymes d'origine animale actifs en milieu faiblement alcalin, les phosphatases acides de l'urine et de la taka-diastase, ne paraissent pas contenir de phytophosphatase (phytase); elles hydrolysent faiblement l'inositolmonophosphate et d'une façon encore moins marquée l'inositoltriphosphate; elles sont pratiquement sans action sur les inositoltétra, penta et hexaphosphates.

Les préparations de prostate et de diverses graines contiennent par contre un mélange de phytophosphatase et de phosphomonoestérase et ont hydrolysé selon des modalités variables à la fois le β glycérophosphate et les divers esters phosphoriques de l'inositol.

IV. — Il semble que l'inositolpentaphosphate isolé des germes de Blé et que nous avons étudié soit plutôt un véritable inositolpentaphosphate qu'un mélange équimoléculaire des acides inositoltétra- et hexaphosphoriques.

a) Il ne dévie pas la lumière polarisée tandis que l'inositoltétraphosphate possède un faible pouvoir rotatoire.

b) Il n'est pratiquement pas attaqué par l'acide periodique et la solution nitro-chromique; ces deux réactifs, le second principalement oxydent d'une façon beaucoup plus marquée l'inositol.

c) Il est hydrolysé par divers enzymes bien plus lentement qu'un mélange équimoléculaire d'inositoltétra et d'inositolhexaphosphates.

Nos recherches ne permettent pas de préciser avec une certitude absolue la structure des inositolphosphates étudiés; elles apportent cependant un ensemble de faits permettant de considérer les structures proposées comme les plus probables.

Vu :
Le Président de la Thèse.
P. FLEURY.

Vu : Paris le 3 juin 1948.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
R. FABRE.

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris.
Le Vice-Président du Conseil de l'Université de Paris,
A. CHOLLEY.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1914, *17*, 141.
2. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1914, *17*, 171.
3. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1914, *18*, 441.
4. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1915, *20*, 463.
5. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1915, *20*, 475.
6. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1920, *43*, 117.
7. ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1920, *43*, 469.
8. ANDERSON R. J. — LOTHROP W. C. et CREIGHTON M. M. — *J. biol. Chem.*, 1938, *125*, 299.
9. BAILLY M. C. (Mlle). — *J. Pharm. Chim.*, 1938, *28*, 199.
10. BAILLY M. C. (Mlle). — *C.R. Ac. Sc.*, 1938, *206*, 1902.
11. BAILLY O. — *Thèse Doct. Sc. Phy.*, Paris. 1916.
12. BESSE DE LAROMIGNIÈRE S. (Mlle). — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*), Marseille, 1942.
13. BIGET P. — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*), Paris, 1943.
14. BODANSKY. — *Journal of. biol. Chem.*, 1932, *99* - 197
15. BOISSON R. (Mlle). — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*), Paris, 1939.
16. BOWER C. A. — *Soil. Sc.*, 1945, *59*, 277.
17. BOWER C. A. — *Soil. Sc.*, 1945, *59*, 297.
18. CASON J. et ANDERSON R. J. — *J. biol. Chem.*, 1938, *126*, 526.
19. CLARKE G. — *J. Chem., Soc.*, 1914, *105*, 535.
20. CLUTTERBUCK P. W. et REUTER F. — *J. Chem. Soc.*, 1935, *138*, 1467.
21. CORDEBARD H. — *J. Pharm. Chim.*, 1939, *30*, 203.
22. CORDEBARD H. — *Thèse Doct. Etat* (*Pharmacie*), Nancy 1941.
23. COURTOIS). — *Thèse Doct. Sc. Phys.*, Paris, 1938.
24. COURTOIS J. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1942, *9*, 136.
25. COURTOIS J. — *Ann. ferment*, 1943, *8*, 105.
26. COURTOIS J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, *27*, 411.
27. COURTOIS J. — *Produits pharmaceutiques*, 1947, *2*, 5.
28. COURTOIS J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, *30*, 37.
29. COURTOIS J. — *Exposés annuels Biochimie Médicale*, 1949, *9*, 225.
30. COURTOIS J. et BARRÉ R. — *Bull. Soc. Chim., Biol.*, 1946, *28*, 854.
31. COURTOIS J. et PEREZ C. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, *30*, 20.

32. Courtois J. et Ramet. — *Bull. Soc. Chim.*, France 1944, *11*, 539.
Courtois J. et Ramet. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, *27*, 610, 614.
Courtois J. et Ramet. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, *27*, 614, 618.
33. Cousin D. — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*), Paris, 1944.
34. Dangschat G. — *Naturwiss*, 1942, *30*, 146.
35. Desjobert A. — *C.R., Ac., Sc.*, 1947, *224*, 575.
36. Desjobert A. — *Bull. Soc. Chim.*, France, 1947, *14*, 809.
37. Du Mont H. et Anderson R. J. — *Z. Physiol. Chem.*, 1932, *211*, 97.
38. Fiévet-Guinard Y. (Mlle). — *Thèse Doct Univ.* (Pharmacie), Paris, 1945.
39. Fischer H. et Dangschat G. — *Helv. Chim. Acta*, 1934, *17*, 1196.
40. Fischer H. et Dangschat G. — *Helv. Chim. Acta*, 1934, *17*, 1200.
41. Fischer H. et Dangschat G. — *Helv. Chim. Acta*, 1934, *17*, 1204.
42. Fischer H. et Dangschat G. — *Helv. Chim. Acta*, 1937, *20*, 705.
43. Fischler F. — *Chem. Abstr.*, 1940, p. 2394.
44. Fleury P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, *28*, 282.
45. Fleury P. — *Fiches techniques de Chimie Biologique*, (Sang 21, Supl. 1947). — Edit. Véga, Paris.
46. Fleury P. et Balatre P. — *Les Inositols. Chimie et Biochimie*. — Edit. Masson et Cie, Paris, 1947.
47. Fleury P. et Courtois J. — *Enzymologia*, 1937, *1*, 377.
48. Fleury P. et Courtois J. — *Ann. Chim, Anal*, 1941, *23*, 117.
49. Fleury P. et Courtois J. — *Biochimica et Biophysica Acta*, 1947, *1*, 256.
50. Fleury P. et Courtois J. — *Bull. Soc. Chim.*, France, 1947, *14*, 358.
51. Fleury P. et Courtois J. — *Bull. Soc. Chim.*, France, 1948, *15*, 190.
52. Fleury P., Courtois J. et Desjobert A. — *C.R.*, 1948, *226*, 801.
53. Fleury P., Courtois J. et Desjobert A. — *Bull. Soc. Chim.*, France, 1948, 694.
54. Fleury P. et Jolly (Mlle). — *J. Pharm. Chim.*, 1937, *26*, 341.
55. Fleury P. et Lange J. — *J. Pharm. Chim.*, 1933, *17*, 196, 313, 409.
56. Fleury P. et Paris R. — *J. Pharm. Chim.*, 1933, *18*, 470.
57. Fleury P., Poirot G. et Fiévet Y. (Mme). — *Ann. Pharm. Françaises*, 1947, *5*, 209.
58. Folch J. — *Fédération Proc.*, 1946, *5*, 134.
59. Folch J. et Wooley D. W. — *J. biol. chem.*, 1942, *142*, 963.
60. François M. et Boismenu E. — *J. Pharm. Chim.*, 1915, *11*, 49.
61. Hérissey H. — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*), Paris, 1899.
62. Kiessling W. — *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, 1935, *68* 243.
63. Klenk E. et Sakai R. — *Z. Physiol. Chem.*, 1939, *258*, 33, 38.
64. Lange J. — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*). Paris, 1933.
65. Macheboeuf M. A. et Dieryck J. — *Vol. du VIe Congrès de Chimie Biol. de Lyon*, 1937, p. 261.
66. Posternak S. — *C.R.*, 1919, *168*, 1216.
67. Posternak S. et Th. — *C.R.*, 1928, *186*, 261.

68. POSTERNAK S. et Th. — *Helv. Chim. Acta*, 1929, *12*, 1165.
69. POSTERNAK S. et Th. — *Helv. Chim. Acta*, 1929, *12*, 1174.
70. POSTERNAK Th. — *Die Methoden der Fermentforschung*, 1941, p. 1681.
71. POSTERNAK Th. et RAVENNA F. — *Helv. Chim. Acta*, 1947, *30*, 441.
72. POSTIC F., COURTOIS J. et RABATÉ J. — *J. Pharm. Chim.*, 1941, *1*, 526.
73. PRICE C. et KROLL H. — *J. Amer, Chem. Soc.*, 1938, *60*, 2726.
74. RATHER J. B. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1917, *39*, 777.
75. RATHER J. B. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1918, *40*, 523.
76. ROCHE J. et COURTOIS J. — *Exposés annuels de Biochimie Médicale*, 1944, *4*, 259.
77. SUZUKI V., YOSHIMURA K. et TAKAHASHI M. — *Bull. Coll. of. Agric.*, Tokio, 1907, *7*, 503.
78. VALENTINO A. (Mlle). — *Thèse Doct. Univ.* (*Pharmacie*). Paris, 1944.
79. WRENSHALL C. et DYER W. — *Soil. Sc.*, 1941, *51*, 235.
80. YOSHIDA R. K. — *Soil. Sc.*, 1945, *59*, 277.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 9

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I. — Les inositolphosphates actuellement décrits 15

CHAPITRE II. — A) Techniques analytiques utilisées au cours de nos recherches pour déterminer la composition des inositolphosphates 21

B) Techniques analytiques utilisées pour l'étude de la structure des inositolphosphates 25

CHAPITRE III. — Technique de préparation des inositolphosphates étudiés au cours de ce travail 31

DEUXIÈME PARTIE

Action de divers oxydants sur les esters hexa - penta - tétra et triphosphoriques de l'inositol

CHAPITRE I. — Action des divers oxydants sur les esters penta et hexaphosphoriques 39

CHAPITRE II. — Action des divers oxydants sur l'acide inositoltétraphosphorique 43

CHAPITRE III. — Action des divers oxydants sur l'acide inositoltriphosphorique 47

CHAPITRE IV. — Action des oxydants sur quelques polyols dérivant du cyclohexane 49

TROISIÈME PARTIE

Action de diverses préparations phosphatasiques sur quelques inositolphosphates

Introduction 81

Protocole des essais 85

Hydrolyses comparées de l'inositolpentaphosphate et d'un mélange équimoléculaire d'inositoltétra et hexaphosphates. 95

Conclusions générales 97

Bibliographie 103

ACHEVÉ D'IMPRIMER
LE 9 JUILLET 1948
SUR LES PRESSES
DE L'IMPRIMERIE
DE LA S. D. E.
13, RUE DE CHARTRES
A CHATEAUDUN
DÉPOT LÉGAL
3e TRIMESTRE
N° 13